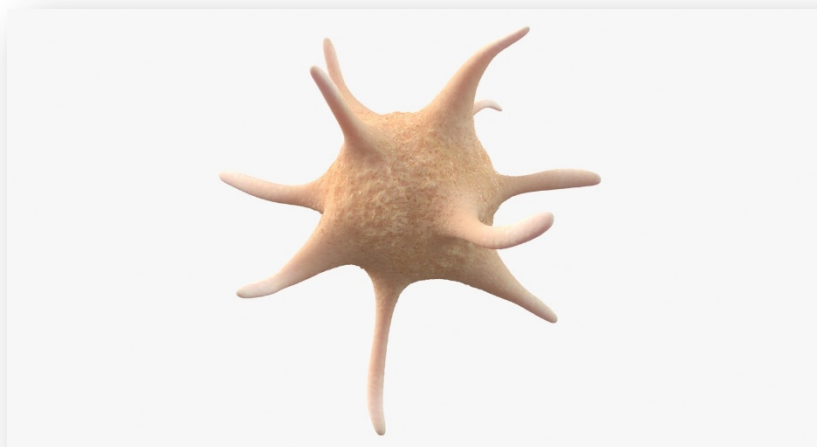


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA



Tesis doctoral

**Biomarcadores intraplaquetarios y de
crecimiento en esclerosis sistémica**



Bryan Josué Flores Robles
Madrid, 2020

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Biomarcadores intraplaquetarios y de crecimiento en
esclerosis sistémica**

Memoria para optar al grado de doctor
Presentada por el Licenciado en Medicina
Bryan Josué Flores Robles

Directores:

Dr. José Luis Andréu Sánchez
Dra. María Alejandra Sánchez López

Madrid, 2020

AUTORIZACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

D. José Luis Andréu Sánchez, Doctor en Medicina, jefe de servicio de Reumatología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid) y Profesor asociado de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y,

Dña. María Alejandra Sánchez López, Doctora en Biología e Investigadora del Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Segovia de Arana

Certifican:

Que D. Bryan Josué Flores Robles, Licenciado en Medicina y especialista en Reumatología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “Biomarcadores intraplaquetarios y de crecimiento en esclerosis sistémica”, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Este estudio se ha llevado a cabo en el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid)

D. José Luis Andréu Sánchez

Dña. María Alejandra Sánchez López

Madrid, agosto de 2020

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por concederme la oportunidad de haber encontrado en mi camino a las personas adecuadas para mi formación y aprendizaje.

En segundo momento, agradecer a mi director, el doctor en Medicina José Luis Andréu Sánchez, quien es mi mayor influencia e inspiración. A mi codirectora de este trabajo, la doctora en Biología María Alejandra Sánchez López, ya que su profesionalismo y pasión por la ciencia me han cambiado la forma de ver la investigación. También al doctor en Medicina, Juan Mulero Mendoza por ser la luz de conocimiento que nos ha guiado a muchos.

Por último, y no por ello menos importante, a mi dulce madre quien ha dedicado cada minuto de su vida a darme su amor; y a mi esposa, la mujer que me motiva día a día.

En estos casi cinco años de realización de la presente tesis doctoral he aprendido que la constancia y disciplina llevan al ser humano a donde el talento no lo hace.

He aprendido en este tiempo que para alcanzar algo concreto hay que ser un profesional enfocado, comprometido y lleno de voluntad.

Los pacientes me han enseñado que las buenas decisiones provienen de la experiencia, y la experiencia a su vez se enriquece de las decisiones subóptimas.

Durante este período también he entendido que la mejor forma de analizar un problema presente es dar todo por ello, estudiar su naturaleza y descubrir la respuesta al problema dentro del propio problema y no conformarse con lo sencillo.

Creo que la manera de crecer en el campo de la ciencia es ser un inconforme en todas las áreas de la vida.

Todo esto no sería posible sin la amabilidad, confianza y entrega de nuestros pacientes que son la razón de nuestra noble profesión.

Dedico este trabajo todo aquel que se tome el tiempo de leerlo.

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

La esclerosis sistémica (ES), es una enfermedad autoinmune sistémica grave caracterizada por vasculopatía, desregulación del sistema inmune, así como fibrosis cutánea y de órganos internos. La angiogénesis es un proceso complejo regulado por factores tanto angiogénicos como angiostáticos. Normalmente las funciones de estos factores se encuentran bajo un balance adecuado. La plaqueta podría contribuir en diversas maneras al desarrollo de la enfermedad ya que es una célula con un alta carga de sustancias biológicas (factores de crecimiento y angiogénicos).

Se incluyó a 23 pacientes con ES y 16 controles. Se obtuvieron muestras de plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP). Por último, se cuantificaron los factores seleccionados tanto en PRP como en PPP y los valores obtenidos se normalizaron por el plaquetocrito.

Los objetivos fundamentales del estudio fueron:

- 1) Cuantificar los niveles de las interleucinas, factores de crecimiento, y angiogénicos (TFG- β , VEGF-A, PDGF-BB, FGF2, G-CSF, HGF, MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-13) en PRP y PPP en pacientes con ES y sus respectivos controles.
- 2) Comparar los niveles de estas interleucinas y factores de crecimiento en PRP respecto a PPP.
- 3) Establecer comparaciones entre los niveles de interleucinas y factores de crecimiento tanto en PRP como en PPP de pacientes con ES respecto a controles.

Los grupos (pacientes y controles) en cuanto a edad fueron homogéneos. Los resultados del presente trabajo fueron los siguientes:

- a) Los niveles intraplaquetarios (PRP) de los factores de crecimiento y angiogénicos estudiados fueron mayores respecto a los niveles plasmáticos (PPP) tanto en pacientes como en controles.
- b) Los niveles de factores de crecimiento intraplaquetarios (PRP) y en plasma (PPP) fueron similares en pacientes con esclerosis sistémica comparados con controles a excepción del VEGF-A, cuyos niveles intraplaquetarios (PRP) fueron significativamente menores en pacientes respecto controles.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (ES) is a severe systemic disease characterized by vascular injury, dysregulation of the immune system, as well as fibrosis of the skin and internal organs. Angiogenesis is a complex process regulated by both angiogenic and angiostatic factors. Normally the functions of these factors are under adequate balance. The platelet could contribute in several ways to the development of the disease since it is a cell with a high load of biological substances (growth and angiogenic factors).

In this study 23 patients with systemic sclerosis and 16 controls were consecutively included. Samples of rich plasma platelet (RPP) and poor plasma platelet (PPP) were obtained. Finally, the selected factors were quantified in both RPP and PPP and the values obtained were normalized by the number and size of platelets.

The fundamental objectives of the study were as follows:

- 1) Quantify the levels of growth and angiogenic factors and interleukins (TFG- β , VEGF-A, PDGF-BB, FGF2, G-CSF, HGF, MCP-1, IL 1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-13) in RPP and PPP in patients with systemic sclerosis and their respective controls.
- 2) Compare the levels of the growth factors studied in PRP respect to PPP.
- 3) Compare the levels of growth and angiogenic factors in both RPP and PPP of patients respect to controls.

The study results were as follows:

- a) The intraplatelet levels of the growth and angiogenic factors were higher in RPP compared to plasma (PPP).
- b) The levels of growth factors in RPP and PPP were similar in patients with systemic sclerosis compared to controls except for VEGF-A whose levels in RPP were lower in patients than controls.

ÍNDICE

CONTENIDO

RESUMEN/ABSTRACT	5
ÍNDICE	9
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS	13
ABREVIATURAS	14
I. INTRODUCCIÓN	20
1. ESCLEROSIS SISTÉMICA	20
2. EPIDEMIOLOGÍA	20
3. GENÉTICA	21
4. FACTORES AMBIENTALES	23
5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	25
5.1 Cutáneas	25
5.2 Vasculopatía digital	25
5.3 Afectación gastrointestinal	26
5.4 Afectación pulmonar	26
5.5 Afectación cardíaca	27
6. PLAQUETA Y SU PAPEL EN LA ESCLEROSIS SISTÉMICA	28
6.1 Activación plaquetaria	28
6.2 Plaquetas como reguladoras del sistema inmune	28
6.3 Plaquetas y fibrosis	30
6.4 Plaquetas e hipertensión pulmonar	31
6.5 Plaquetas y fenómeno de Raynaud	31
6.5.1 Quimiotaxis	31
6.5.2 Adhesión	32
6.5.3 Angiogénesis	32
6.5.4 Tono vascular y permeabilidad	32
6.6 Disfunción plaquetaria en esclerosis sistémica	33
6.6.1 Número plaquetario y estructura	33

6.6.2 Agregación plaquetaria.....	33
6.6.3 Liberación plaquetaria de contenido granular.....	33
6.6.4 Glucoproteínas de membranas plaquetarias.....	33
6.6.5 Biosíntesis de eicosanoides.....	33
7. FACTORES DE CRECIMIENTO Y ANGIOGÉNICOS.....	33
II. HIPÓTESIS.....	37
III. OBJETIVOS.....	37
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1. PACIENTES.....	39
1.1 Criterios de inclusión.....	39
1.2 Criterios de exclusión.....	39
1.3 Retirada del estudio.....	40
2. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE DATOS.....	40
2.1 Videocapilaroscopia.....	40
2.2 Pruebas de función respiratoria.....	41
2.3 Ecocardiograma y TACAR.....	41
2.4 Valoración de clínica extrapulmonar.....	41
2.5 Otros parámetros.....	41
3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS (PRP Y PPP)	41
3.1 Manipulación y preparación de muestras.....	43
3.2 Cuantificación de analitos en PRP y PPP.....	43
3.3 Determinación de ELISA competitivo.....	43
3.4 Determinación de factores por Luminex Simplex.....	44
3.5 Determinación de factores por Luminex Multiplex.....	45
4. Análisis estadístico y procesamiento de datos.....	45
V. RESULTADOS.....	49
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS.....	49
2. COMPARACIÓN DE FACTORES EN PRP RESPECTO A PPP.....	51
3. COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS (PACIENTES/CONTROLES)	55
VI. DISCUSIÓN.....	60

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLOGICAS.....	61
2. FACTORES DE CRECIMIENTO EN PRP Y PPP.....	52
2.1 TGF- β	62
2.2 PDGF-BB.....	62
2.3 VEGF-A.....	62
2.4 FGF-2.....	64
2.5 G-CSF.....	66
2.6 HGF.....	66
2.7 MCP-1.....	67
2.8 IL-1.....	68
2.9 IL-6.....	68
2.10 IL-8.....	69
2.11 IL-13.....	69
2.12 Cuestiones finales y limitaciones del estudio.....	70
VII. CONCLUSIONES.....	73
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	75
IX. ANEXOS.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Edad específica de la incidencia de esclerosis sistémica.

Figura 2. Papel de la plaqueta en inflamación, fibrosis y vasculopatía.

Figura 3. Niveles de factores de crecimiento en PRP y PPP.

Figura 4. Niveles de factores de crecimiento en PRP vs. PPP.

Figura 5. Niveles de interleucinas en PRP y PPP.

Figura 6. Niveles en PPP de factores de crecimiento (pacientes vs. controles).

Figura 7. Niveles en PRP de factores de crecimiento (pacientes vs. controles).

Figura 8. Valores de VEGF-A en PPP y PRP (pacientes y controles).

Figura 9. Valores intraplaquetarios de la isoforma VEGF-A_{165b}.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de clasificación (ACR/EULAR) para esclerosis sistémica.

Tabla 2. Genes y polimorfismos asociados a esclerosis sistémica.

Tabla 3. Sustancias presentes en el interior de la plaqueta.

Tabla 4. Citocinas y factores involucrados en la esclerosis sistémica.

Tabla 5. Características generales de pacientes y controles.

Tabla 6. Niveles de factores de crecimiento en PRP y PPP.

Tabla 7. Niveles de factores de crecimiento en PPP (pacientes y controles).

Tabla 8. Niveles de factores de crecimiento en PRP (pacientes y controles).

ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS:

AC: Anticuerpos

ANAs: Anticuerpos antinucleares

ACR: Colegio Americano de Reumatología, del inglés *American College of Rheumatology*

AR: Artritis reumatoide

CEIC: Comité de Ética de Investigación Clínica

COX-1: Ciclooxygenasa tipo I

CPT: Capacidad pulmonar total

CTGF: Factor de crecimiento derivado del tejido conectivo, del inglés *Connective Tissue Growth Factor*

CVF: Capacidad vital forzada

DE: Desviación estándar

DLCO: Capacidad de difusión de monóxido de carbono

EGF: Factor de crecimiento endotelial, del inglés *Endothelial growth factor*

EPID: Enfermedad pulmonar intersticial difusa

ES: Esclerosis sistémica

EULAR: Liga Europa contra el reumatismo, del inglés *European League Against Rheumatism*

FC: Factores de crecimiento

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *Fibroblast Growth Factor*

FR: Fenómeno de Raynaud

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos, del inglés *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

HBsAg: Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

HGF: Factor de crecimiento derivado de hepatocitos, del inglés *Hepatocyte Growth Factor*

HLA: Antígeno leucocitario humano, del inglés *Human Leukocyte Antigen*

HTP: Hipertensión arterial pulmonar

HUPHM: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleucina

LES: Lupus eritematoso sistémico

MCP-1/CCL2: Proteína quimiotáctica de monocitos, del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés *Major Histocompatibility Complex*

MMP-1: Metaloproteinasas tipo 1

MMP-2: Metaloproteinasas tipo 2

MSP-1: Proteína estimuladora de macrófagos, del inglés *Macrophage Stimulating Protein*

NINE: Neumonía intersticial no específica

NIU: Neumonía intersticial usual

NK: Células asesinas naturales, del inglés *Natural Killer*

PCR: Proteína C reactiva

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *Platelet Derived Growth Factor*

PF4: Factor plaquetario 4, del inglés *Platelet Factor*

PIGF: Factor de crecimiento placentario, del inglés *Placental Growth Factor*

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PRP: Plasma rico en plaquetas

RIC: Rango intercuartílico

SS: Síndrome de Sjögren

sPAP: Presión arterial pulmonar sistólica

TACAR: Tomografía axial computarizada de alta resolución

T CD4⁺: Células T CD4 positivo

T CD8⁺: Células T CD8 positivo

TGF- β : Factor de crecimiento transformador-beta, del inglés *Transforming Growth Factor*.

Th: Células T *helper*

TIMP-1: Proteínas tisulares inhibitorias de las metaloproteinasas de matriz extracelular tipo 1, del inglés *TIMP* *metlopeptidase inhibitor 1*

UHNT: Unidad de Hemoterapia no Transfusional

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VPM: Volumen plaquetario medio

VSG: Velocidad de sedimentación globular

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ESCLEROSIS SISTEMICA

La esclerosis sistémica (ES), es una enfermedad grave del tejido conectivo que se caracteriza fundamentalmente por disfunción de la microcirculación, desregulación del sistema inmune y fibrosis de diversos órganos ⁽¹⁾. Existen dos subgrupos de enfermedad que son comúnmente aceptados en los distintos criterios de clasificación: ES limitada y ES difusa ⁽²⁾.

Una de las características fundamentales es su heterogeneidad pudiendo afectar a múltiples órganos, siendo el marcador principal la sobreproducción y acumulación de colágeno y otros productos de la matriz extracelular ⁽³⁾. Hasta el día de hoy se desconoce la etiología de la enfermedad pero los fenómenos predominantes son mecanismos inmunológicos, daño endotelial y la activación de fibroblastos ^(1,4). La rareza de la enfermedad, los diversos subtipos y la variabilidad del curso de la misma obstaculizan diseñar estudios con un número suficiente de pacientes con características homogéneas. Hasta fechas recientes los criterios de clasificación de Le Roy y cols. (1988) eran los más utilizados en la inclusión de pacientes en los ensayos clínicos ⁽⁵⁾.

Desde su aparición en el año 1980 los criterios preliminares del *American College of Rheumatology* (ACR) se utilizaron ampliamente. Sin embargo, debido a su escasa sensibilidad, ACR y la *European League Against Rheumatism* (EULAR) revisaron los criterios en 2013, realizando una nueva clasificación y validando dicha herramienta, con una sensibilidad del 96% vs. el 88% de los criterios antiguos ⁽⁶⁾ (**Tabla 1**).

2. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la ES varía de 0,7/100.000 a 53/100.000 habitantes, dependiendo sobre todo de la demografía y ciudad, siendo esta más alta en Estados Unidos comparada con Europa y Japón ⁽⁷⁾. Sin embargo, la prevalencia real de la ES se ha subestimado probablemente porque la enfermedad con afectación leve discurre a menudo sin diagnóstico ⁽⁷⁾. La incidencia anual notificada de nuevos casos se sitúa en torno a 1-20 por millón, considerándose así una enfermedad rara ⁽⁷⁾. La ES tiene una mortalidad aumentada comparada con la población general siendo la *ratio* de mortalidad del 2,7. De hecho, la ES es la enfermedad reumática con una de las tasas estandarizadas de mortalidad más altas, siendo la afectación pulmonar una de las principales causas de muerte ⁽⁸⁾. La enfermedad afecta fundamentalmente a mujeres (proporción 3:1 respecto a hombres) en el rango de edad de los 35-65 años ^(8,9) (**Figura 1**).

Aun con los datos anteriores los resultados de los estudios de incidencia y prevalencia de ES son conflictivos debido a la variación metodológica con la que han sido realizados, así como a las diferencias geográficas de cada región ⁽¹⁾. Se ha observado un incremento de susceptibilidad de padecer de la enfermedad en la raza negra ⁽¹⁰⁾.

Tabla 1. Criterios (ACR/EULAR) para la clasificación de ES (2013)

Ítem	Sub ítem(s)	Puntuación
Engrosamiento de la piel de los dedos de ambas manos que se extiende proximal a las articulaciones metacarpofalángicas (criterio suficiente)	-	9
Engrosamiento de la piel de los dedos (solo cuenta la puntuación más alta)	-Dedos tumefactos -Esclerodactilia (distal a las articulaciones metacarpofalángicas pero proximal a las articulaciones interfalángicas proximales)	2 4
Lesiones en la punta de los dedos (solo cuenta la puntuación más alta)	-Úlceras digitales -Cicatrices en pulpejos	2 3
Telangiectasias	-	2
Anormalidades en capilares de lecho ungueal	-	2
Hipertensión arterial pulmonar y/o enfermedad pulmonar intersticial (puntuación máxima 2)	-Hipertensión arterial pulmonar -Enfermedad pulmonar intersticial	2 2
Fenómeno de Raynaud	-	2
Autoanticuerpos relacionados con esclerosis sistémica (puntuación máxima 3)	-Anticentrómero -Anti-topoisomerasa I (anti-SCL-70) -Anti-RNA polimerasa III	3

(Adaptado de Van den Hoogen et al. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72 (11): 1747-1755⁽⁶⁾).

En cuanto al vínculo familiar hay una frecuencia mayor en los familiares de estos pacientes de padecer enfermedades de perfil autoinmune, sugiriendo así que la genética juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad ^(11,12).

3. GENÉTICA

La patogénesis de la ES es muy compleja y hasta el día de hoy no hay una teoría que unifique todos sus aspectos. Sin embargo, el papel de los factores genéticos está respaldado por la observación de la agregación familiar de la enfermedad, la alta frecuencia de otros trastornos inmunitarios, positividad para anticuerpos (AC) en familias de pacientes con ES y la mayor prevalencia de ciertos antígenos de leucocitos humanos y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en diversas etnias con ES ⁽⁸⁻¹²⁾.

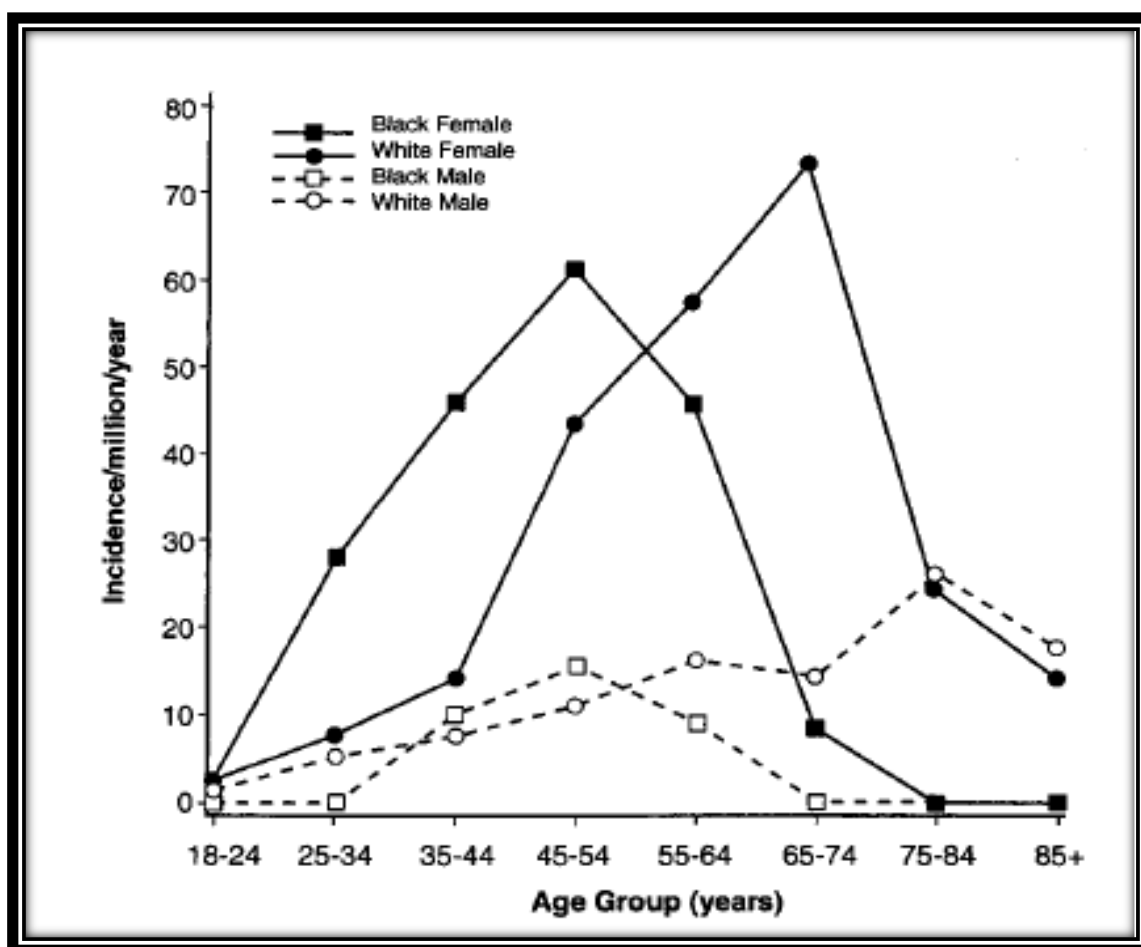


Figura 1: Edad específica de la incidencia de ES por sexo y raza. (Mayes MD et al. *Arthritis and Rheum.* 2003; 48:2. 246-255 ⁽¹³⁾).

Las moléculas HLA (antígeno leucocitario humano) de clase I que juegan un papel en el desarrollo de la ES son: HLA-A, B, C, y G. Las de clase II incluyen: HLA-DP, DQ y DR ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Los esfuerzos multicéntricos y transnacionales han permitido la creación de grandes cohortes, que son imperativas para investigar el componente genético en los trastornos complejos. Los resultados más convincentes se han obtenido en el componente autoinmunitario, con replicación en grandes estudios que han identificado al *HLA*, *IRF5* y *STAT4* como principales genes implicados ⁽¹⁸⁾ (**Tabla 2**).

4. FACTORES EPIDEMIOLOGICOS Y AMBIENTALES

En cuanto a los factores ambientales y epidemiológicos asociados al riesgo de desarrollo de ES, en 2018 se publicó una revisión bibliográfica ⁽¹⁹⁾. A continuación se describen los resultados.

a) Historia familiar

Siete estudios evidenciaron una historia familiar positiva como factor de riesgo para ES y en cuatro de ellos se sugiere que es el factor de riesgo más importante en el desarrollo de ES con una *Odds Ratio* (OR) que varía entre 10 y 16. En contraste los otros tres estudios argumentan que es poco probable que la genética familiar sea el principal factor de riesgo para el desarrollo de ES.

b) Exposición a solventes orgánicos

La exposición ocupacional a disolventes orgánicos se investigó en 18 estudios, con resultados variables. Once de esos artículos encontraron una correlación positiva con la exposición ocupacional a solventes orgánicos con una OR variable entre 2,07 y 2,91. En dos de esos estudios se observó que dicha correlación era significativa en hombres, pero no en mujeres.

c) Exposición ocupacional a sílice

La exposición ocupacional al sílice se investigó en 14 estudios. En nueve (incluyendo un metaanálisis) de ellos se encontró que era un factor de riesgo significativo de ES, con una OR variable entre 3,20 y 25. En contraste, el resto de estudios concluyeron que dicha exposición ocupacional era significativa en hombres y no en mujeres.

d) Infecciones

La exposición a infecciones como factor de riesgo para el desarrollo de ES se investigó en ocho estudios con resultados heterogéneos. Por ejemplo, cuatro de los estudios concluyen que existe una correlación positiva entre la exposición a infecciones y el desarrollo de ES. El resto de los estudios concluye que no hay evidencia suficiente para implicar a las bacterias o los virus como factor de riesgo para el desarrollo de ES.

e) Fumadores de cigarrillos y consumo de alcohol

Los seis estudios realizados que investigaron a fumadores y consumo de alcohol como factores de riesgo para el desarrollo de ES no encontraron una correlación positiva ni que ninguno de ellos fuera un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

f) Microquimerismo

El microquimerismo se define como la persistencia de células retenidas de un feto previo en las muestras de sangre periférica de la madre. El microquimerismo fue la variable principal de estudio en ocho estudios, siendo en 5 de ellos el microquimerismo mayor en pacientes con ES comparado con controles sanos.

Tabla 2. Genes y polimorfismos relacionados con ES y su relación con tipos de AC

Cromosoma	Gen	Subtipo	SNP	Población	Anticuerpos
Xq28	<i>IRAK 1, MECP2</i>	dSSc	rs1059702 rs3027935	-España -USA	ACA, ATA ACA, ATA
6p21.32	<i>HLA-DPB1, DPB2, DRB1</i>	Ambos	rs3128930, rs764491, rs 763822, rs3128965	-Korea	Scl70
	<i>HLA-DQB1</i>		rs3117230, rs7763822, rs7764491	-Hispanos -Caucásicos	ACA ARA
2q32.3	<i>STAT4</i>	ISSc dSSc	rs7574865 rs11889341, rs8179673, rs1018656	-Europa -Japón	ACA ATA
3q25	<i>IL12A</i>	ISSc	rs77583790	-Europa	ACA
7q32	<i>IRF5</i>	dSSc ISSc	rs2004640, rs2280714, rs10954213, rs10488631	-Europa -Japón	ACA
8p23.1	<i>C8orf-13BLK</i>	ISSc	rs2736340 rs13277113	-USA -España	ACA
1q25.1	<i>TNFSF4</i>	ISSc	rs2205960 rs844648 rs1234314	-Europa	ACA Scl70
6q23.1	<i>CTGF</i>	Ambos	rs6918698, rs9399005	-Europa, Japón	-
1q22.23	<i>CD247</i>	Ambos	rs2056626	-Europa, China	-

Anticuerpos anticentrómero (ACA), anticuerpos anti RNA-polimerasa (ARA), anticuerpos anti-topoisomerasa (ATA), quinasa tipo BL (BLK), *cluster* de diferenciación (CD), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), esclerosis sistémica difusa (dSSc), antígeno leucocitario humano (HLA), IL (interleucina), quinasa asociada al receptor de la interleucina 1 (*IRAK*), factor regulador de interferón (IRF), esclerosis sistémica limitada (ISSC), proteína de unión a metil-CpG 2 (*MECP-2*), polimorfismo de base única (SNP), SNP de referencia (rs), proteína de transducción de señal y activador de la transcripción (*STAT*), superfamilia del factor de necrosis tumoral alfa (*TNFSF*). (Adaptado de Rezaei R. et al. *Int J Rheum Dis*. 2018; 21:1478–1486 ⁽¹⁸⁾).

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En cuanto a las manifestaciones clínicas se refiere, más allá de los procesos fibróticos y vasculares que experimentan, estos pacientes suelen cursar con fatiga y dolor ⁽²⁰⁾. La ES se denomina habitualmente esclerodermia porque su aspecto más visible es la “piel dura”. Sin embargo, es una enfermedad sistémica y, además de los cambios estéticos en la cara y extremidades, la alteración orgánica da lugar a alteración funcional, y, en ocasiones, progresión a insuficiencia orgánica o multiorgánica terminal ⁽²¹⁾. Al principio, algunos pacientes presentan cambios mínimos lo que dificulta el establecimiento del diagnóstico. Sin embargo, el diagnóstico precoz es esencial para instaurar un tratamiento apropiado dirigido a bloquear la progresión de la enfermedad.

5.1 Manifestaciones cutáneas

La afectación cutánea es casi un hallazgo universal en los pacientes con ES. Se caracteriza porque la extensión de la afectación cutánea varía de un paciente a otro en severidad y en grado de endurecimiento. Los dedos de las manos y la cara son las zonas que se afectan de manera más precoz. Adicionalmente, el edema y eritema preceden a la aparición de las zonas de endurecimiento cutáneo ⁽²²⁾. Dentro de las manifestaciones cutáneas más destacables se encuentran: prurito y edema en estadios tempranos, piel con zonas de hiperpigmentación-despigmentación (piel en sal y pimienta), piel seca, lipopatofia, úlceras digitales, telangiectasias y calcinosis cutánea.

5.2 Vasculopatía Digital

El primer síntoma de la ES es el fenómeno de Raynaud (FR) en los dedos de las manos, pies, orejas y nariz ⁽²³⁾. Este fenómeno se caracteriza por crisis vasoespásticas episódicas que causan constricción de los vasos sanguíneos. El FR se presenta con tres cambios en la coloración de la piel: palidez (en respuesta al espasmo de las arteriolas y el colapso consiguiente de las arterias digitales), seguida de cianosis (isquemia) y, finalmente, rubefacción, cuando se produce la dilatación por reperusión. La duración de la crisis dura de menos de un minuto hasta varias horas. La videocapilaroscopia del lecho ungueal muestra una diversidad de cambios morfológicos, como megacapilares, patrones vasculares arborescentes, microhemorragia y zonas de pérdida capilar, con o sin áreas avasculares ^(24,25).

Como complicación del FR y la isquemia crónica pueden aparecer úlceras digitales que afectan tanto a paciente con ES limitada como difusa. El desarrollo de úlceras digitales ocurre casi en un 50% de los pacientes y se asocian a un peor pronóstico de la enfermedad ⁽²⁵⁾.

5.3 Afectación gastrointestinal

La fibrosis puede afectar a todo el aparato digestivo y atrofiar las paredes de estos órganos. Además de lo anterior, la lesión del sistema nervioso autónomo intestinal puede causar dismotilidad. De hecho entre el 75 y 90% de los pacientes con ES padecen de dismotilidad esofágica y sus secuelas ⁽²⁶⁾. Al menos el 50% presentan afectación gástrica. Un 40-70% de pacientes padecen de afectación del intestino delgado y en torno del 50% afectación del colon y patología anorrectal ⁽²⁷⁾.

La presencia de malabsorción y disfunción esofágica se asocian a un mal pronóstico en estos pacientes ⁽²⁸⁾. Adicionalmente, los pacientes con afectación gastrointestinal tienen riesgo incrementado de muerte temprana, especialmente en aquellos con malnutrición. La patología esofágica se caracteriza por disfunción muscular de la porción inferior del esófago. Esto provoca una reducción de la peristalsis y de la continencia del esfínter esofágico inferior que se manifiesta por episodios de disfagia y reflujo ⁽²⁹⁾.

La manifestación gástrica más común en la ES es la gastroparesia ⁽³⁰⁾. Por otro lado, la ectasia vascular del antro gástrico “en sandía” es una complicación poco frecuente. Esta última tiene un aspecto endoscópico singular que se caracteriza por bandas longitudinales de vasos rojos, que se limitan al antro gástrico y discurren de forma radial ⁽³¹⁾.

El intestino delgado puede dilatarse, volverse átono y perder su función propulsora. En estas condiciones, las bacterias que se encuentran normalmente crecen de forma desproporcionada y dañan la mucosa que absorbe los alimentos. Lo anterior da lugar a malabsorción con pérdida significativa de nutrientes esenciales.

En cuanto a la afectación de colon y anorrectal esta última es la zona que se afecta con mayor frecuencia ⁽³²⁾. La incontinencia es el síntoma más frecuente de afectación anorrectal, comprometiendo negativamente la calidad de vida de los pacientes. En las etapas más tardías de afectación suele aparecer disminución de la presión en reposo tanto del esfínter externo como interno debido al depósito de colágeno ⁽³³⁾.

5.4 Afectación pulmonar

La patología pulmonar es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con ES, ya que complica a menudo la enfermedad subyacente y provoca una pérdida de la calidad de vida y reducción de la esperanza de supervivencia ⁽³⁴⁾. La alveolitis, el engrosamiento de las membranas y/o modificación de la estructura microvascular son los principales rasgos distintivos de la afectación pulmonar, que, con la progresión de la enfermedad dan lugar a enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) e hipertensión pulmonar (HTP). La neumonía intersticial inespecífica es el patrón histológico más frecuente ⁽³⁵⁾.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de pacientes con EPID son la disnea de esfuerzo, tos no productiva e hipoxemia. También puede observarse hemoptisis cuando existe fibrosis avanzada. La radiografía de tórax permite determinar los volúmenes pulmonares y distribución de los infiltrados, así como la presencia de patología pleural y linfadenopatías. Sin embargo, la radiografía de tórax no es lo suficientemente sensible para excluir fibrosis pulmonar ya que el 10% de los pacientes pueden presentar sintomatología con una radiografía de tórax normal ⁽³⁶⁾.

Las pruebas de función respiratoria pueden revelar un patrón restrictivo con reducción de la capacidad vital forzada (CVF) o la capacidad pulmonar total (CPT) junto con disminución de la capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono (DLCO) ⁽³⁷⁾. Los defectos ventilatorios restrictivos constituyen el hallazgo más común, sin embargo, en el momento en que se diagnostican estos defectos mediante espirometría, la enfermedad pulmonar ya está bastante avanzada ⁽³⁷⁾.

La tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR) es la técnica no invasiva de referencia para el diagnóstico de EPID en pacientes con ES. Se reconoce que la TACAR es una herramienta sensible para predecir las características histológicas de las anomalías del parénquima pulmonar en los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Permite visualizar el parénquima pulmonar con un detalle notable, constituyendo así una prueba no invasiva alternativa a la biopsia ⁽³⁸⁾. El patrón de “vidrio esmerilado” denota zonas de alveolitis y el patrón reticular en “panal de abeja” es más frecuentes en zonas de fibrosis crónica aunque no descarte que haya en esa zona cambios inflamatorios.

La HTP es un proceso grave y potencialmente mortal que puede desarrollarse en pacientes con ES. Ocurre cuando los vasos sanguíneos que irrigan los pulmones se constriñen y luego se vuelven más rígidos y gruesos a causa de la fibrosis irreversible. La mayor resistencia en la circulación pulmonar dificulta que la sangre fluya a través de los vasos pulmonares y obliga al corazón a bombear con más fuerza. Algunos pacientes pueden cursar con HTP y EPID de manera simultánea ⁽³⁴⁾. El ecocardiograma constituye la herramienta de primera línea para la valoración de la HTP ya que puede estimar la presión arterial pulmonar (sPAP) utilizando los valores de los flujos valvulares, sin embargo, esta aproximación puede inducir a error, sobre todo en el tramo de 30-50 mmHg, por lo que ante la sospecha de HTP, es necesario efectuar cateterismo cardíaco derecho ⁽³⁹⁾.

5.5 Afectación cardíaca

Todos los dominios anatómicos pueden estar afectados en la ES. Este tipo de afectación es común en estos pacientes y cursa con síntomas de disnea, fatiga y palpitaciones. Dentro de las afectaciones más relevantes debido al mecanismo fisiopatológico subyacente de la enfermedad se encuentra la inflamación a nivel de miocardio, pericardio y fibrosis del sistema de conducción.

Los pacientes con enfermedad cardíaca sintomática tienen un peor pronóstico con una mortalidad de hasta el 70% en el intervalo de 2-5 años ⁽⁴⁰⁾. El reconocimiento temprano de la patología cardíaca y el diagnóstico de cardiotoxicidad permiten el tratamiento inmediato y la prevención de complicaciones potencialmente mortales.

Los pacientes con ES tienen un riesgo aumentado de infarto agudo de miocardio comparado con la población general ⁽⁴¹⁾. En cuanto a las arritmias, estas son frecuentes en pacientes con ES siendo el resultado de la fibrosis de los sistemas de conducción. Muchas de las muertes súbitas de estos pacientes son debidas a arritmias ventriculares ⁽⁴²⁾.

6. CONTRIBUCION DE LA PLAQUETA EN LA PATOGENESIS DE LA ES

6.1 Activación

Las plaquetas tienen una vida corta (8-12 días), son células anucleadas y juegan un papel importante en la homeostasis, trombosis, inflamación y reparación tisular ⁽⁴³⁾. Las plaquetas son capaces de inducir tanto vasodilatación como vasoconstricción a través de la liberación de sustancias vasoactivas. Adicionalmente pueden inducir quimiotaxis y liberar durante su activación y agregación diversas sustancias biológicamente activas con la consecuente cascada inflamatoria y profibrótica. En la **tabla 3** se enumeran las sustancias que contienen y pueden liberar las plaquetas.

En los tejidos lesionados las plaquetas se adhieren a las zonas subendoteliales expuestas, especialmente al colágeno tipo I y III, agregándose y posteriormente, activándose, liberando una serie de sustancias biológicamente activas como se ha mencionado anteriormente. Estos procesos están autorregulados para mantener la homeostasis a nivel tisular ⁽⁴³⁾. En las últimas décadas se ha demostrado la activación plaquetaria y liberación de su contenido en pacientes con ES ⁽⁴⁴⁾. Por ejemplo, se han descrito depósitos glomerulares y vasculares de antígenos plaquetarios en estudios anatomopatológicos ⁽⁴⁴⁾. Otro ejemplo de lo anterior lo demuestra un estudio en el que los niveles de agregados plaquetarios y en plasma de beta tromboglobulina fueron significativamente más altos en pacientes con ES comparados con controles ⁽⁴⁵⁾. Por otro lado, se ha demostrado que las plaquetas de pacientes con ES son resistentes a la inhibición de la agregación a diferencia de las plaquetas de donantes ⁽⁴⁶⁾.

6.2 Plaquetas como reguladoras del sistema inmune.

Las plaquetas no solo ejercen una función central en la hemostasia. Durante las últimas décadas, la evidencia acumulada sugiere su papel como reguladoras claves de la respuesta inmune, pudiendo así participar en la patogénesis de diversas enfermedades inmunomediadas como el lupus

eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR) o la enfermedad inflamatoria intestinal ^(47,48).

Se ha demostrado que las plaquetas actúan como células presentadoras de antígenos activando así a las células T a través del MHC I ⁽⁴⁹⁾. Moléculas tales como CD40L (CD154) se expresan en la superficie plaquetaria y pueden conducir a la interacción con células B y su activación. La interacción entre CD154 de las células T y el CD40 en las células B conduce a la proliferación, producción de AC, cambio de isotipo, así como generación de células B de memoria.

Tabla 3. Sustancias presentes en el interior plaquetario

Mediadores inflamatorios	Quimiocinas	Citocinas	Factores de crecimiento
Óxido nítrico	MCP-3	IL-18	PDGF-A, B, C, D
Serotonina	IL-8	GM-CSF	TGF- β 1 y 2
Tromboxano A ₂	CCL5		EGF
PGD ₂ , PGE ₂ , PGF _{2α}	MIP-1 α		VEGF-A y C
12-HETE			BDNF
PF-4			IGF-1
NAP-2			HGF
PAF			FGF-2
Adenosina			CTGF
Histamina			
Nucleótidos de adenina			
Selectina P			
Ligando CD40			
Dinucleótidos			
Polifosfatos			
2-araquidonilglicerol			
MMP-2			

Factor neutrófico derivado del cerebro (BDNF), ligandos de quimiocinas CC (CCL), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), ácido 12-hidroxieicosatetraenoico (12-HETE), factor de crecimiento derivado de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), interleucina (IL), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP), proteína inflamatoria macrofágica (MIP), metaloproteína (MMP), péptido activador de neutrófilos (NAP), factor activador plaquetario (PAF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor plaquetario (PF), prostaglandina (PG), factor de crecimiento transformador (TGF). (Adaptado de Itallino JE et al. Michelso AD, editor. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002:21–35 ⁽⁴³⁾).

Las plaquetas pueden ser el puente de enlace entre la activación endotelial y la activación del sistema inmune. Aunque las plaquetas carecen de núcleo el mecanismo de biosíntesis se mantiene intacto ⁽⁵⁰⁾.

Además, los gránulos plaquetarios contienen moléculas que no tiene ningún papel en la hemostasia. Se sabe que muchas de estas moléculas tienen un papel en la inmunomodulación actuando así o como células proinflamatorias o antiinflamatorias. De esta manera, se entiende cómo las plaquetas pueden interactuar tanto con el sistema inmune innato como en el adquirido. Un ejemplo concreto de esto es el factor PF4 (CXCL4), también denominado factor plaquetario 4, que participa en el reclutamiento y la maduración de los monocitos o la interleucina 1 β , una citocina con múltiples acciones en las células tanto de la inmunidad innata como adquirida ^(51,52).

Adicionalmente, algunos estudios sugieren el papel de la serotonina en la respuesta inmune adaptativa ⁽⁵³⁾. En concreto, se ha observado que la serotonina refuerza la activación de las células T a través de la activación del receptor 5-HT₇ ⁽⁵³⁾. Diversos estudios con inhibidores de receptores 5-HT₁ y de 5-HT₂ han mostrado que la inhibición en la señalización de la serotonina es capaz de frenar la proliferación y maduración de las células T ^(54,55).

6.3 Plaquetas y fibrosis. Evidencia experimental del perfil profibrótico

Múltiples experimentos fundamentan el papel de la plaqueta como célula profibrótica, debido fundamentalmente a que contienen cantidades importantes de TGF- β en sus gránulos α ⁽⁵⁶⁾. Los datos experimentales en lo referente a fibrosis hepática han demostrado el perfil profibrótico de las plaquetas. Por ejemplo, en un estudio el TGF- β y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) liberado de las plaquetas tenían un papel importante como mediadores de la actividad profibrótica plaquetaria. Los investigadores encontraron que el lisado plaquetario *in vitro* inducía la proliferación de células estrelladas del hígado de ratones ⁽⁵⁷⁾.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un potente inductor de fibrosis estimulando a los fibroblastos e incrementando por tanto la cantidad de colágeno ⁽⁵⁸⁾. En pacientes con ES, el PDGF se expresa en altas concentraciones en la piel ⁽⁵⁹⁾, lavado broncoalveolar ⁽⁶⁰⁾ y sangre periférica ⁽⁶¹⁾.

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la serotonina producida por las plaquetas potencia la producción de colágeno en los fibroblastos, actuando específicamente en los receptores de serotonina 5HT_{2B} de su superficie ⁽⁶²⁾.

Finalmente, la inhibición plaquetaria por el clopidogrel conduce a una disminución de los niveles de serotonina en piel y con ello disminuye el grosor de esta ⁽⁶²⁾. Otro ejemplo, que pone de manifiesto el papel profibrótico de la serotonina es el síndrome carcinoide, una enfermedad caracterizada por niveles altos de serotonina y fibrosis ⁽⁶³⁾. La evidencia acumulada implica a las plaquetas

en la patogénesis de la fibrosis pulmonar en diversos modelos animales, aunque se desconoce la relación de causa directa ⁽⁶⁴⁾.

Otra de las moléculas que es producida por las células plaquetarias es la histamina ⁽⁴³⁾. La histamina es un mediador químico presente en diversos tejidos y, que además, puede funcionar como un factor de crecimiento ⁽⁶⁵⁾. La histamina puede ser inducida en tejidos con alta capacidad de reparación, como es el caso del hígado y la piel ⁽⁶⁶⁾. Asimismo regula varios de los procesos de inflamación, no solo como un mediador bioquímico en las etapas tempranas de ese proceso sino también como un modulador de la biosíntesis y reparación de heridas en la inflamación crónica ⁽⁶⁷⁾. Existen pocos estudios que evalúen los niveles de histamina en pacientes con ES, sin embargo, se han demostrado niveles elevados en pacientes con ES difusa comparados con aquellos con ES limitada ⁽⁶⁸⁾.

6.4 Hipertensión arterial pulmonar y la plaqueta

No se ha demostrado de manera clara si las plaquetas de los pacientes HTP están constitutivamente más activadas comparadas con sujetos normales debido a que los estudios realizados son contradictorios ^(69,70). Estos resultados no sorprenden debido a la heterogeneidad de los pacientes reclutados y la variedad de metodología utilizada. Además de lo anterior los niveles de serotonina se encuentran elevados en pacientes con HTP ⁽⁷¹⁾. Se ha observado que las micropartículas derivadas de plaquetas (partículas submicrónicas) tienen características protrombóticas y proinflamatorias, estando elevadas en pacientes con HTP ⁽⁷²⁾ (**Figura 2**).

Aunque hay evidencia creciente de que los factores derivados de plaquetas están incrementados en pacientes con HTP, siendo la trombosis un hallazgo común, aún se desconoce si este hallazgo es consecuencia o causa de la HTP.

6.5 Contribución de las plaquetas en la patogénesis del fenómeno de Raynaud

Recientemente la atención de las plaquetas se ha centrado en sus funciones biológicas más que en sus funciones en la hemostasis, demostrándose cada vez de manera más fehaciente su papel como célula inmune. Este conocimiento ha permitido describir y reconocer su papel en algunas enfermedades tales como asma ⁽⁷³⁾, fibrosis quística ⁽⁷⁴⁾ y cáncer ⁽⁷⁵⁾.

A continuación, se resumen las funciones plaquetarias como célula clave en la inflamación y fenómenos vasculares.

6.5.1) Quimiotaxis. Las plaquetas son una fuente de CCL5, PF-4, y CXCL5 ⁽⁷³⁾. Todos ellos son factores claves en la quimioatracción de neutrófilos, eosinófilos y monocitos a los lugares de inflamación.

6.5.2) Adhesión celular. La selectina-P es una glucoproteína que pertenece a las moléculas de adhesión y es importante en la activación, adhesión y agregación plaquetaria. La selectina-P es el receptor primario para la interacción de las plaquetas con los neutrófilos, células T, y células *natural killer* (NK), modulando la expresión de citocinas en estas células ⁽⁷⁴⁾.

6.5.3) Angiogénesis. Como se ha descrito previamente, las plaquetas son una fuente rica en moléculas proangiogénicas tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimientos derivado de fibroblastos (FGF) así como el PDGF ⁽⁷⁶⁾. Estas moléculas compiten con factores antiangiogénicos liberados por otras células para mantener un balance. Sin embargo, en pacientes con ES parece no ocurrir de esa manera, conduciendo de esta manera a pérdida capilar y desregulación en los pequeños vasos tanto en forma como en tamaño.

6.5.4) Tono vascular y permeabilidad. Las plaquetas producen un panel de mediadores vasoactivos que pueden promover vasoconstricción (tromboxano, serotonina, PDGF) o vasodilatación (óxido nítrico), aunque en líneas generales el balance del tono vascular favorece la vasoconstricción.

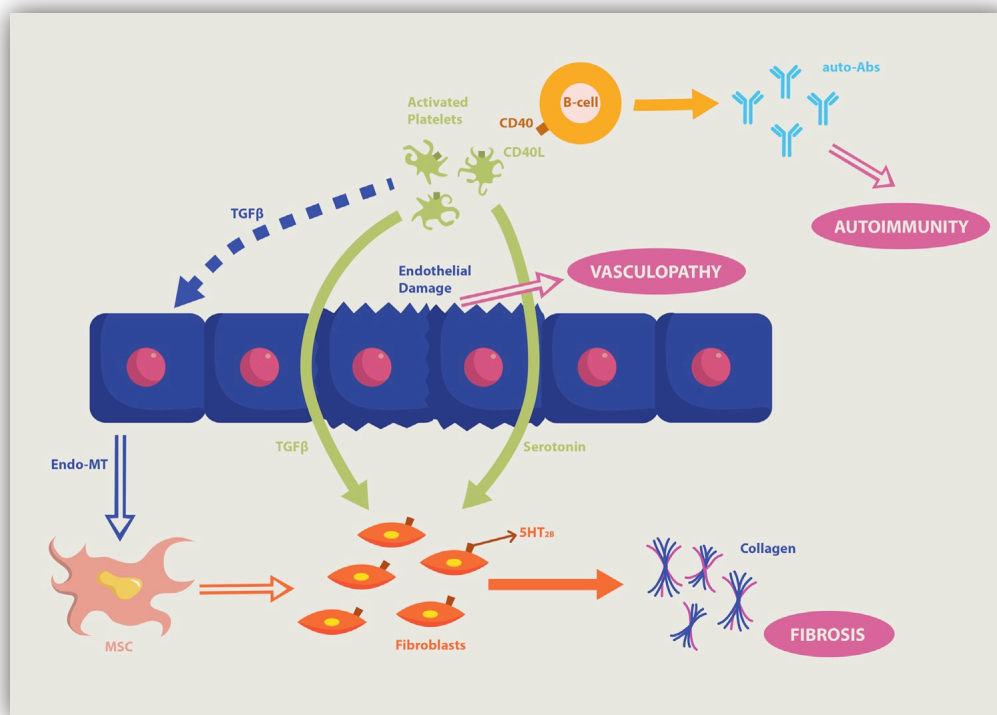


Figura 2: Esquema que demuestra el papel de la plaqueta en los 3 componentes de la ES: fibrosis, inflamación y vasculopatía. (Nadaud S et al. *Eur J. Clin. Invest.* 2013; 43:64–71 ⁽⁷⁷⁾).

6.5 Evidencia de la disfunción plaquetaria en pacientes con fenómeno de Raynaud y ES

Con la creciente apreciación del papel de la plaqueta en lo referente a la vasoconstricción, inflamación y remodelado tisular, no sorprende que las plaquetas hayan atraído la atención en su potencial patogénico en el FR en pacientes con ES.

6.6.1) Número plaquetario y estructura. El número de plaquetas en el plasma de pacientes con ES y FR se encuentra generalmente en el límite de la normalidad. Sin embargo, en aquellos casos en los que existe trombocitopenia esto es generalmente debido a que son pacientes con manifestaciones clínicas sobrepuestas de otras enfermedades inflamatorias tales como vasculitis ⁽⁷⁸⁾.

6.6.2) Agregación plaquetaria. La vasta mayoría de estudios en estos pacientes han demostrado aumento (*ex vivo*) el incremento de la agregación plaquetaria, comparado con controles sanos ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾. Adicionalmente en pacientes con ES y FR las plaquetas son menos sensibles a los efectos inhibitorios de agregación plaquetaria de las prostaglandinas (PGI₂ y PGE₁) comparado con controles sanos ⁽⁸²⁾.

6.6.3) Liberación plaquetaria de contenido granular. Este tema se discutirá en el apartado de FC y angiogénicos.

6.6.4) Glucoproteínas de membranas plaquetarias. Múltiples estudios han identificado niveles elevados de formas solubles de selectina P en pacientes con ES comparado con controles sanos ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾.

Los niveles de selectina P se correlacionan con los niveles circulantes del factor de von Willebrand en pacientes con ES y especialmente en aquellos con formas cutáneo-difusas ⁽⁸⁴⁾. El antagonista del receptor de endotelina ha demostrado disminuir los niveles de endotelina y de otras moléculas de adhesión en pacientes con ES ⁽⁸⁶⁾.

6.6.5) Biosíntesis de eicosanoides. Se ha demostrado niveles elevados de tromboxano B₂ en pacientes con ES comparados con controles sanos ⁽⁸¹⁾. Adicionalmente, los leucocitos también tienen la capacidad de producir tromboxano A₂ y los niveles de expresión de los genes que codifica para la tromboxano sintasa se encuentran elevados en pacientes con ES ⁽⁸⁸⁾.

7. FACTORES DE CRECIMIENTO Y ANGIOGÉNICOS

Se cree que la disfunción endotelial vascular es una de las alteraciones más tempranas y uno de los pasos iniciales en la patogénesis de la ES ⁽³⁾. La lesión endotelial, precedida por activación endotelial, involucra principalmente a la microcirculación y está mediada por citocinas producidas por linfocitos activados. Los linfocitos activados secretan citocinas y quimiocinas, que provocan lesión de las células endoteliales. Posteriormente, se generan factores de crecimiento como el TGF- β o el PDGF, que aumentan la producción de matriz

extracelular ⁽⁸⁹⁾. Por su parte, el PDGF a su vez, promueve la proliferación de células endoteliales y regula a la baja el VEGF, que favorece generalmente la neovascularización ^(90,91). Todo ello conduce progresivamente a la aparición de anomalías en la microvasculatura.

En recientes años se han estudiado diversos factores proangiogénicos y anti-angiogénicos demostrando su papel en el desarrollo de esta enfermedad ⁽⁹²⁾. Dentro de los factores angiogénicos y de crecimiento con niveles elevados en ES tenemos el VEGF- α , PDGF $\beta\beta$, TGF- β 1, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IL-1, IL-6, IL-8, entre otros ⁽⁹²⁻⁹⁶⁾.

Muchas de estas moléculas han sido estudiadas por separado en pacientes con ES, con resultados contradictorios. Adicionalmente, algunos de estos estudios han demostrado que los niveles de estos factores se correlacionan con actividad de la enfermedad. En la **tabla 4** se describe el papel de las diversas citocinas y factores de crecimiento y angiogénicos en la ES.

Tabla 4. Citocinas y FC involucrados en la patogénesis de ES

Variable	Célula productora	Relevancia patogénica	Efecto en ES
IL-1	Macrófagos, monocitos	Contribuye a la producción de IL-6 y PDGF- α en los fibroblastos	Se expresa de manera constitutiva en fibroblastos de la piel
IL-4	Linfocitos Th2	Estimula la proliferación de fibroblastos, quimiocinas, síntesis de colágeno, estimula la producción de TGF- β , CTGF	Niveles elevados en suero, incrementa la expresión de genes de fibroblastos en la dermis, incrementa el número de linfocitos T productores de IL-4
IL-6	Fibroblastos, macrófagos, células T y B, células endoteliales	Estimula la síntesis de colágeno, promueve la polarización a células Th2	Niveles elevados en tejidos y suero. Refuerza la producción <i>in vitro</i> de fibroblastos
IL-8	Macrófagos alveolares, fibroblastos de pulmón, fibroblastos de piel	Potente quimioatrayente y activador de neutrófilos, promueve la quimiotaxis de fibroblastos	Niveles elevados en suero, piel y lavado broncoalveolar
IL-10	Células B activadas, monocitos	Promueve la respuesta Th2 que induce la síntesis de colágeno	Niveles incrementados en suero
IL-13	Linfocitos Th2	Induce la fibrosis a través de mecanismos TGF- β dependientes y TGF- β independientes	Niveles incrementados en suero
IL-17	Linfocitos Th1 y Th2	Induce la proliferación de fibroblastos, estimula producción de colágeno por los fibroblastos, estimula la producción de IL-1 y TNF- α por macrófagos, induce la expresión de moléculas de adhesión endotelial	Niveles incrementados en suero. Sobreexpresión en piel
TGF- β	Macrófagos, células T, células B, plaquetas y células endoteliales	Induce proliferación de fibroblastos, estimula la síntesis de colágeno, fibronectina, inhibición de la degradación de la matriz extracelular, estimula la expresión de receptores de TGF- β y PDGF α	Niveles elevados en suero y aumento de su expresión en piel

CTGF	Fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso	Inducido por TGF- β , IL-4 y VEGF. Induce quimiotaxis y proliferación de fibroblastos y estimula la producción de matriz extracelular	Niveles elevados en suero, sobreexpresión genética en piel y fibroblastos (<i>in vitro</i>)
TNF- α	Macrófagos, fibroblastos, células T, células B, células endoteliales, células de músculo liso	Estimula la respuesta profibrótica o antifibrótica según las condiciones experimentales	Resultados contradictorios en pacientes tratados con inhibidores de TNF- α
MCP-1	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales	Estimula la producción de colágeno	Niveles elevados en suero y aumento de su expresión en piel.
PDGF	Plaquetas, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos	Mitógeno y quimioatrayente de fibroblastos, estimula la síntesis de colágeno, fibronectina, estimula producción de TGF- β , MCP-1. IL-6	Niveles incrementados en lavado broncoalveolar, sobreexpresión en piel

Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), Interleucina (IL), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformador (TGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). (Adaptado de Gabirelli A, et al. *NEJM*. 2009; 360: 1989-2003 ⁽⁹⁷⁾).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS

Las plaquetas debido a su pequeño tamaño circulan permanentemente por el torrente sanguíneo, encontrándose así en proximidad y en continua interacción con el endotelio por lo que podrían ser potencialmente claves en la patogenia de la ES.

El papel de las plaquetas en la ES y otras enfermedades profibróticas no está completamente definido. Habitualmente la estimulación y activación de los fibroblastos por las plaquetas en el tejido dañado es un mecanismo para acelerar la curación y prevención de hemorragia. Sin embargo, si estos mecanismos no se encuentran regulados y se ponen en marcha en tejido sano, se compromete la estructura no solo de los vasos sanguíneos sino de los tejidos de alrededor.

La plaqueta podría contribuir de diversas maneras al desarrollo de la ES ya que, es una célula con un alta carga de sustancias biológicas que se activan al existir daño tisular.

En ese sentido, en múltiples estudios en pacientes con ES se ha demostrado niveles altos en suero de interleucinas, factores de crecimiento y angiogénicos respecto a controles sanos. Sin embargo, pocos estudios han centrado su atención de dichos factores de crecimiento y angiogénicos en el sobrenadante plaquetario. Desde el punto de vista fisiopatológico sería de interés medir los niveles de todos estos factores en pacientes con ES y específicamente en la estirpe celular plaquetaria.

Es por ello que podrían existir diferencias en los niveles de factores de crecimiento tanto en plasma rico en plaquetas (PRP) como en plasma pobre en plaquetas (PPP) en pacientes con ES y que además, dichos niveles permitirían establecer diferencias cuantitativas y cualitativas respecto a controles sin enfermedad.

III. OBJETIVOS

1. Cuantificar los niveles de las interleucinas, factores de crecimiento, y angiogénicos (TFG- β , VEGF-A, PDGF-BB, FGF2, G-CSF, HGF, MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-13) en PRP en pacientes con ES.
2. Cuantificar los niveles de las interleucinas, factores de crecimiento, y angiogénicos (TFG- β , VEGF-A, PDGF-BB, FGF2, G-CSF, HGF, MCP-1, IL 1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-13) en PPP en pacientes con ES.
3. Comparar los niveles de estas interleucinas y factores de crecimiento en PRP respecto a PPP.
4. Establecer comparaciones entre los niveles de interleucinas y factores de crecimiento tanto en PRP como en PPP de pacientes con ES respecto a controles.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

Se incluyeron de manera consecutiva 24 pacientes con ES que cumplían criterios de Le Roy y cols ⁽²⁾ valorados en los diferentes servicios del Hospital Universitario Puerta de Hierro Madrid, Majadahonda (HUPHM) y que, durante el seguimiento se hubieran realizado al menos un estudio videocapilaroscópico, pruebas de función respiratoria, ecocardiograma y TACAR (en los casos que existía afectación pulmonar). En aquellos pacientes que no contaban con dichas pruebas se solicitó su realización, previa obtención de consentimiento informado y autorización por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC). Se accedió a los registros de los pacientes para obtener parámetros clínicos, serológicos y demográficos. Posteriormente, se evaluó de manera presencial a los pacientes en una única ocasión para obtener los distintos índices y cuestionarios. La valoración clínica de los pacientes se llevó a cabo por el mismo reumatólogo, el cual no tuvo intervención terapéutica adicional. La videocapilaroscopia se realizó por un reumatólogo experto distinto al reumatólogo que realizó la valoración clínica.

El protocolo para la realización de este estudio fue aprobado por el CEIC del HUPHM. Se obtuvo un consentimiento informado para la inclusión y uso de muestras de sangre y plasma de cada uno de los participantes de acuerdo con los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Derechos Humanos en Helsinki. Adicionalmente, se obtuvo un segundo consentimiento informado de los pacientes para la realización de aféresis plaquetaria en banco de sangre del HUPHM. A continuación, se describen los criterios de inclusión y exclusión y los supuestos para la retirada del estudio.

1.1 Criterios de inclusión

- Cumplir criterios de Le Roy y cols ⁽²⁾ de ES y ser mayor de 18 años.
- Ser capaz de comprender y firmar voluntariamente un documento de consentimiento informado antes de la realización de cualquier evaluación.

1.2 Criterios de exclusión

- Falta de compromiso por parte del paciente realizarse las pruebas solicitadas.
- Presencia de otras enfermedades autoinmunes y/o reumáticas.
- Serología previa positiva a antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o sífilis.
- Trombopenia menor de $100 \times 10^9/L$.
- Concentración de hemoglobina $< 12 \text{ g/dL}$ en mujeres y $< 13 \text{ g/dL}$ en hombres.
- Mal acceso venoso que impidiera la realización de la plaquetoféresis.

1.3 Retirada del estudio

La participación en el estudio fue completamente voluntaria. Un paciente tenía el derecho de retirarse del estudio en cualquier momento y por cualquier motivo. A los pacientes que retiraron su consentimiento se les consideró retirados del estudio. El investigador podía suspender la participación de cualquier sujeto por cualquier razón, por ejemplo, incumplimiento de protocolo o enfermedad grave concurrente. Se retiró a los sujetos del estudio inmediatamente en cualquiera de las siguientes circunstancias:

- Decisión justificada del investigador, con inclusión de la evaluación de los datos obtenidos hasta ese momento.
- Retirada del consentimiento informado (decisión del sujeto de estudio).

2. Procedimiento de obtención de datos

2.1 Videocapilaroscopia

Se utilizó un videocapilaroscopio equipado con lentes de aumento 100x y 200x, conectando las imágenes a un *software* para su análisis (*MoticImage Plus 2.0*). Cada paciente se encontraba en una habitación con una temperatura entre 20-22 °C. Los diez dedos de las manos fueron valorados previa aplicación de una gota de aceite de inmersión para mejorar la resolución de las imágenes. En base a los hallazgos capilaroscópicos, los pacientes se clasificaron según los patrones de Cutolo ⁽⁹⁸⁾. Los patrones incluidos fueron los siguientes:

a) Patrón precoz: escasos megacapilares (menos de 4 capilares afectados por mm), escasas hemorragias capilares, conservación de la distribución capilar, no evidencia de pérdidas capilares.

b) Patrón activo: frecuentes megacapilares (más de seis capilares por mm), frecuentes hemorragias capilares, moderadas pérdidas capilares (20-30%), leve desorganización de arquitectura capilar (4-6 capilares por mm), ausencia o pocos capilares ramificados.

c) Patrón tardío: elongaciones capilares irregulares, ausencia o pocos megacapilares, ausencia o pocas hemorragias capilares, severas pérdidas capilares (50-70%) con amplias zonas avasculares y desorganización de la arquitectura capilar, podía haber capilares ramificados.

2.2 Pruebas de función respiratoria

Se realizaron pruebas de función pulmonar y se midieron los distintos parámetros, siendo los más importantes CVF, DLCO y el índice DLCO/volumen alveolar (DLCO/AV).

2.3 Estudios de imagen (ecocardiograma, tomografía de alta resolución)

La ecocardiografía se realizó por un cardiólogo, de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía ⁽⁹⁹⁾. Se midió la fracción de eyección ventricular según el método de Simpson. Se midieron además los valores de sPAP. Se consideró como HTP a la sPAP mayor a 35mmHg o DLCO menor a 50% del predicho en ausencia de fibrosis pulmonar.

En cuanto a la TACAR se definió como EPID a aquellos pacientes que presentaban áreas en vidrio deslustrado, panal de abeja o patrones reticulares difusos.

2.4 Valoración clínica extrapulmonar

Se valoró la afectación esofágica en aquellos pacientes que contaban con manometría o estudio baritado. La afectación articular se evaluó mediante el hallazgo de artritis o artralgias inflamatorias. En cuanto a la afectación cardíaca se consideró presente en aquellos pacientes con pericarditis, insuficiencia cardíaca, bloqueo o arritmias cardíacas atribuidas a la enfermedad. La afectación cutánea incluyó: presencia de FR, test cutáneo modificado de Rodnan ⁽¹⁰⁰⁾, presencia de úlceras digitales (definida por pérdida de la epitelización y tejidos presentes en la epidermis, dermis o tejido subcutáneo), telangiectasias, calcinosis (definida como el depósito de calcio en tejidos blandos visibles a la inspección clínica o confirmada por rayos X).

2.5 Otros parámetros relevantes medidos

Perfil de AC y pruebas autoinmunes realizadas durante el seguimiento con especial énfasis en AC anti Scl-70, anticentrómero, factor reumatoide y AC antinucleares (ANAs).

3. Obtención de muestras: Extracción de PPP y PRP

El PRP se obtuvo en la Unidad de Hemoterapia no Transfusional (UHNT) del HUPHM. Los pacientes que cumplían los criterios de inclusión fueron remitidos a la UHNT donde fueron informados del procedimiento.

Seguidamente se sometieron a una entrevista por uno de los investigadores con el fin de detectar alguna patología que contraindicara el proceso de extracción. En esa visita se realizó una extracción de sangre para obtener un hemograma y una serología de HBsAg, VHC, VIH y sífilis. Los pacientes que presentaron alguna prueba microbiológica positiva, anemia o trombopenia como se define en los criterios de exclusión, fueron rechazados.

En el procedimiento se obtuvieron los siguientes productos, para una posterior determinación de los FC:

- Plasma Pobre en Plaquetas (PPP): Plasma del paciente virtualmente desleucocitado ($< 1 \times 10^6$ leucocitos por unidad de producto), sin plaquetas y sin hematíes.
- Plasma Rico en Plaquetas de alta concentración. (PRP-AC, que en adelante para simplificar se denominará PRP): Plasma del paciente virtualmente desleucocitado ($< 1 \times 10^6$ leucocitos por unidad de producto), sin hematíes, y con una concentración de plaquetas de $1200 \times 10^9/L$ (rango 1100-1300).

Todos los pacientes, fueron sometidos al mismo proceso de aféresis usando una máquina *Trima Access*, que se programó para obtener 50 mL de PPP y 85 mL de PRP mediante un proceso clásico de plaquetoaféresis usando como anticoagulante ACD-A. (Acido-Citrato-Dextrosa-Adenina). Las muestras se mantuvieron *overnight* a 20° para permitir la disgregación plaquetaria y hacer posteriormente el recuento de células. El conteo celular se realizó con un contador automático *SYSMEX XN100-SA01* en un volumen de 100 uL; para ello se dispuso un volumen algo mayor, aproximadamente 150 uL en un tubo *eppendorf*.

Asimismo se seleccionaron 16 muestras control de las disponibles en la Unidad de Hemoterapia no Transfusional (UHNT) del HUPHM procedentes de pacientes derivados fundamentalmente de los servicios de traumatología (por condromalacia, condropatía de rodilla o tendinopatía) y oftalmología (por patología ocular o síndrome de ojo seco). Las muestras seleccionadas estaban pareadas con las muestras de pacientes respecto a la edad, sexo y fecha de realización de aféresis.

Las fracciones (PPP y PRP) obtenidas se alicuotaron con la ayuda de un *sampler* en viales tipo *eppendorfs*, se congelaron a -80°C y se almacenaron hasta la realización de las pruebas de detección de FC. De cada uno de los productos se realizó un hemograma para la determinación de la concentración de plaquetas, leucocitos y hematocrito del producto.

3.1. Manipulación y preparación de las muestras de PRP

De forma previa a su análisis, las muestras se sometieron a un doble ciclo de congelación-descongelación (-80°C, 37°C bloque seco) para romper las membranas celulares de forma mecánica y liberar el contenido plaquetario. A continuación se centrifugaron a 3220 x g 10' a 4°C, obteniéndose el lisado plaquetario donde se determinó la concentración de los diferentes analitos.

3.2. Cuantificación de analitos en muestras de PRP y PPP

Se utilizaron dos metodologías: ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo (para serotonina e histamina) e inmunoensayos *ProcartaPlex* (*invitrogen*) para la plataforma *Luminex: Procarta singleplex* (en el caso de TFG- β 1) y *Procarta multiplex* con un panel customizado (para el resto de FC y angiogénicos e interleucinas). Con el fin de determinar la dilución óptima de las muestras para la realización de los experimentos, se llevaron a cabo pruebas con muestras de PPP y PRP de uno de los pacientes (P13) y uno de los controles (C1) empleando diferentes diluciones de cada una de las muestras. En todos los experimentos las muestras se analizaron por duplicado. Tras la realización y análisis de estas pruebas se acordó:

- a) ELISA serotonina e histamina: En ambos casos se usaron diluciones 1/20 de PPP y PRP.
- b) *Luminex singleplex* TFG- β 1: Usar dilución 1/10 de PPP y PRP.
- c) *Luminex multiplex* (VEGF- α , PDGF $\beta\beta$, HGF, FGF-2, G-CSF, MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-13): Usar muestras sin diluir tanto de PPP como de PRP.

3.3 Determinaciones ELISA competitivo: Histamina y Serotonina.

Se emplearon los kits: *Human his (Histamine) ELISA Kit* (Ref.: EH2552) y *Human 5-hydroxytryptamine FALSE ELISA Kit* (Ref.: EH4005), ambos de *FineTest (Wuhan Fine Biotech Co, Ltd)*.

Preparación de las muestras: Se preparó de cada muestra un tubo con la dilución (1/20): 114 μ L *buffer* de dilución + 6 uL de muestra= 120 uL. Las muestras se analizaron por duplicado empleando 50 μ L de muestra por pocillo.

Preparación *buffer* de lavado: Se mezclaron 30 mL de *buffer* de lavado concentrado 25X con 750 mL de H₂Odd (doble destilada).

Preparación estándares: Se añadió 1 mL de *Buffer* de dilución al tubo con el estándar liofilizado dejándolo 10 minutos a RT y mezclándolo repetidamente. El resto se preparó a dilución 1/2. Es decir, se prepararon tubos *eppendorfs* con 300 uL de *buffer* de dilución y se fueron pasando sucesivamente 300 uL de cada dilución anterior a la siguiente, mezclando al menos 10 veces antes de cada pase. Se preparó un último tubo con 300 uL de *buffer* de dilución que se utilizó como control negativo. Las diluciones de los estándares se mantuvieron en hielo

hasta su dispensación en la placa. En el caso de la serotonina la curva de concentración comprendía desde los 1000 ng/mL hasta 15,625 ng/mL; en caso de la histamina la curva de concentración comprende desde los 100 ng/mL hasta los 1,56 ng/mL.

Preparación de AC de detección biotinilado: El AC de detección biotinilado venía concentrado 100X. Se preparó 60 uL de AC (100X) + 5.940 mL de *buffer* de dilución de AC. Se preparó una hora antes de la realización del experimento y se empleó 50 uL por pocillo.

Preparación de Estreptavidina conjugada con Peroxidasa (PO): La estreptavidina-PO se presentaba concentrada 100X. Se preparó una dilución 1X con 120 µL de estreptavidina-PO (100X) + 11,880 mL de *buffer* de dilución de estreptavidina-PO, 30 minutos antes de su utilización y se empleó 100 µL por pocillo.

Protocolo:

1. Se lavó 2 veces la placa antes de añadir los estándares, las muestras y los controles negativos.
2. Se añadieron 50µL del estándar, muestra diluida o *buffer* (control negativo) en cada pocillo según plantilla previamente diseñada.
3. De forma inmediata se añadieron 50 uL de AC de detección biotinilado a cada pocillo.
4. Se incubó 45 minutos a 37°C.
5. Se aspiró y se lavó 3 veces con *buffer* de lavado.
6. Se añadieron 100 µL de la solución estreptavidina-PO previamente preparada en cada pocillo. Se incubó durante 30 min a 37°C.
7. Se aspiró y lavó 5 veces.
8. Se añadieron 90 µL de sustrato TMB (Tetra-metil-Benzidina). Incubado 15-20' a 37°C.
9. Se añadieron 50 µL de solución STOP (H₂SO₄ 2N). Se realizaron lecturas a 450 nm inmediatamente en el lector de placas *Varioskan Lux Multimode de Thermo Scientific*.
10. Se calculó la curva estándar y el cálculo de concentraciones de cada una de las muestras empleando el *software GraphPad Prism v. 5*.

3.4 Determinación de factores por Luminex Simplex:

Simplex (TGF-β1): Se usó la dilución 1/10 de PPP y PRP.

Preparación de las muestras: pretratamiento de la muestra diluida 1/10:

- Las muestras se descongelaron a 37°C en bloque seco.
- Dilución: 10 uL muestra+ 90 uL de *Universal Assay Buffer*.
- Acidificación: Se añadieron 25 uL de HCl 1N. Se incubó 10' a RT.
- Neutralización: Se añadieron 20 uL de NaOH/0.5M HEPES 1,2 N.
- Se mantuvo en hielo hasta su dispensación en la placa.
- Se emplearon 25 uL de muestra para el ensayo.

Preparación de reactivos y estándares:

- Preparación *Wash buffer* 1X: 20 mL *wash buffer*+180 mL de H₂O dd.
- Preparación beads: Se vortexeó el vial 30'' y se mezcló 100 uL de beads +4,900 mL *Wash buffer* 1X.
- Preparación AC de detección: 60 uL vial de AC de detección. +2,940 mL de *detection AC diluent*.
- Preparación de estándares: Se centrifugó el vial 10''. Se añadieron 50 uL de *Universal Assay Buffer*. Se agitó mediante vórtex 10''. Se centrifugó 10''. Se incubó en hielo 10'. Se completó hasta 250 uL con *Universal Assay Buffer*, esto se denominó estándar 1. El resto se preparó a dilución 1/4. Es decir, se prepararon tubos *ependorfs* con 150 µL de *Universal Assay Buffer* y se pasaron 50 µL sucesivamente de cada dilución anterior, mezclando al menos 10 veces antes de cada pase. Se preparó un último tubo con 150 µL de *Universal Assay Buffer* para el control negativo. Los estándares así preparados se mantuvieron en hielo hasta su dispensación en la placa.

Protocolo:

- Se diseñó una plantilla de la placa de 96 pocillos, con la distribución de muestras.
- Se vortexeó y dispensó 50 uL de beads por pocillo en una placa (96-Well Flat Bottom Plate) opaca para luminometría.
- Se realizaron lavados (2X) con buffer de lavado en lavador automático (*BioPlex Pro II Wash Station* de Bio-Rad).
- Se añadieron 25 uL de *Universal Assay Buffer* por pocillo.
- Se añadieron 25 uL de cada muestra y estándares previamente preparados). Se selló la placa con *film* sellador, se colocó la tapa (*black microplate lid*) y se agitó a 500 rpm 1h a RT.
- Se realizaron lavados (3X) con *buffer* de lavado en lavador automático.
- Se añadieron 25 uL de AC de detección por pocillo. Se selló la placa con *film* sellador, se colocó la tapa (*black microplate lid*) y se agitó a 500 rpm 30'.
- Se realizaron lavados (3X) con buffer de lavado en lavador automático.
- Se añadieron 50 uL de estreptavidina-PO por pocillo. Se selló la placa con *film* sellador, se colocó la tapa (*black microplate lid*) y se agitó a 500 rpm 30'.
- Se realizaron lavados (3X) con buffer de lavado en lavador automático.
- Se añadieron 120 uL de *Reading Buffer* por pocillo. Se selló la placa con *film* sellador, se puso la tapa (*black microplate lid*) y se agitó a 500 rpm 5'.
- Se quitó *film* sellador y se realizó la lectura de la placa en Luminex® 200™ de *Invitrogene*.
- Se calculó la curva estándar y se realizó también el cálculo de concentraciones de cada una de las muestras con el *Luminex xPONENT® Software*, aplicando un algoritmo de ajuste polinómico de 5º grado.

3.5. Determinación de factores por Luminex Multiplex: VEGF- α , PDGF $\beta\beta$, HGF, FGF2, G-CSF, MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-13.

Preparación de las muestras:

Las muestras se usaron sin diluir. Se descongelaron a 37°C en bloque seco manteniéndose en hielo hasta su dispensación en la placa. Se usaron 25 uL de muestra para el ensayo.

Preparación de reactivos y estándares:

- Se preparó *Wash buffer* 1X: 20 mL *wash buffer*+180 mL de H₂O.
- Preparación *beads*: Se vortexó el vial 30''. Se mezclaron 100 uL de *beads* +4,900 mL *Wash buffer* 1X.
- Preparación AC. de detección: 60 uL vial AC +2,940 mL de *detection AC diluent*.

Preparación estándares:

Se centrifugaron los 4 viales de estándares durante 10 segundos. Se añadieron 50 uL de *Universal Assay Buffer* a cada vial. Se agitó mediante vórtex por 10''. Se incubó en hielo 10'. Se mezclaron todos en un solo tubo y se completaron hasta 250 uL con *Universal Assay Buffer*. Éste fue el estándar 1. El resto se prepararon a dilución 1/4. Es decir, se prepararon tubos *eppendorfs* con 150 uL de *Universal Assay Buffer* y se pasaron 50 uL sucesivamente de cada dilución anterior, mezclando al menos 10 veces antes de cada pase. Se preparó un último tubo con 150 uL de *Universal Assay Buffer* para el control negativo. Las diferentes diluciones de estándares se mantuvieron en hielo hasta su dispensación en la placa.

Protocolo:

- Se siguió el mismo protocolo que en el caso de la determinación de TFG- β 1.

4. Análisis estadístico y procesamiento de los datos.

Los parámetros descriptivos estandarizados se estimaron para el análisis estadístico: las variables cuantitativas se muestran como media y desviación estándar (DE) o como mediana y rango intercuartílico (RIC) para las variables con una distribución asimétrica. Las variables cualitativas se presentan como frecuencia y porcentaje absolutos.

Las concentraciones obtenidas de factores e interleucinas en las muestras de PRP se normalizaron con el valor del plaquetocrito (número de plaquetas x volumen plaquetario medio (VPM) /10⁴) correspondiente. De esta manera, se calculó la concentración de cada factor o interleucina en una muestra de PRP que tenía 1000 millones de plaquetas por mL con un volumen plaquetario medio (VPM) de 10 femtolitros (fL).

En los análisis comparativos de las concentraciones de analitos se utilizaron pruebas no paramétricas ya que los valores obtenidos en la mayoría de los factores analizados no seguían una distribución gaussiana. El contenido de los analitos en las muestras de PRP y PPP se comparó utilizando la prueba de *Wilcoxon*. Posteriormente se compararon las concentraciones de factores e interleucinas entre pacientes y controles. Para este análisis, se utilizó una prueba U de *Mann-Whitney* para muestras independientes. Valores de $P \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el *software* SPSS v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Características clínicas y epidemiológicas

Se incluyó de manera consecutiva a 23 pacientes y 16 controles. Los grupos tanto de pacientes como de controles en cuanto edad ($52,13 \pm 9,52$ años vs. $52,78 \pm 9,51$) y sexo (91% mujeres vs. 88%) fueron homogéneos, con niveles de plaquetas, leucocitos y hemoglobina similares previos a la realización de la aféresis plaquetaria (**tabla 5**).

El 74 % de los pacientes presentaban ES difusa, con una duración media de la enfermedad de 95 meses que representa casi 8 años y, un tiempo hasta el diagnóstico de 48,9 meses. De los pacientes incluidos el 68% presentaba afectación pulmonar, siendo esta principalmente EPID. En cuanto al tabaquismo se refiere el 78% habían fumado en algún momento de la vida y únicamente el 22% eran fumadores activos. Un tercio de los pacientes eran hipertensos. Asimismo, un tercio de los pacientes habían presentado úlceras digitales en algún momento de la evolución de la enfermedad. Se observó una diferencia significativa en el plaquetocrito ligeramente superior en controles que en pacientes (1,32 vs. 1,07; $P=0,04$). Esta diferencia fue contemplada al analizar las concentraciones de FC y hacer las comparativas, ya que se normalizó por dicho parámetro.

La totalidad de los pacientes presentaban afectación gastrointestinal, siendo la afectación esofágica la más frecuente. Por último, un tercio de los pacientes se encontraban en tratamiento con ácido acetil salicílico y dos tercios tomaban calcio-antagonistas. El resto de las características demográficas, clínicas y de tratamiento se resumen en la **tabla 5**.

Al realizar el análisis estadístico comparativo en pacientes con afectación pulmonar vs. sin afectación pulmonar no se observaron diferencias significativas en los niveles de factores de crecimiento entre ambos subgrupos. No obstante, el número de pacientes fue insuficiente para sacar conclusiones más precisas. Asimismo, se analizaron los niveles de factores de crecimiento e interleucinas según afectación órgano-específica (gastrointestinal, úlceras digitales), tipo de ES (limitada vs. difusa), tipo de patrón capilaroscópico (precoz vs. tardío), tipo de medicación (con antiagregantes plaquetarios vs. sin antiagregantes plaquetarios), sin encontrar tampoco diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5. Características generales de pacientes con esclerosis sistémica (23) y controles (16)

Características	Pacientes= 23 (%)	Controles= 16 (%)	Observaciones
<i>Mujeres</i>	21 (91)	14 (87,5)	
<i>Edad (años)*</i>	52,13 ± 9,52	52,78 ± 9,51	
<i>Duración de enfermedad (meses)*</i>	95,26 ± 92,01		
<i>Tiempo hasta diagnóstico (meses)*</i>	48,90 ± 74.60		
<i>ES limitada</i>	6 (26)		
<i>ES difusa</i>	17 (74)		
<i>Antecedentes de tabaquismo</i>	18 (78)		
<i>Fumador actual</i>	5 (22)		
<i>Hipertensión arterial</i>	8 (34)		
<i>Diabetes mellitus</i>	1 (4)		
<i>Hipotiroidismo</i>	7 (31)		
<i>Cirrosis biliar primaria</i>	1 (4)		
<i>Antecedentes de úlceras digitales</i>	8 (34)		
<i>Test de Rodnan*</i>	7,30 ± 8.08		
Patrón capilaroscópico			
<i>-Precoz</i>	6/13 (46)		
<i>-Activo</i>	4/13 (30)		
<i>-Tardío</i>	3/13 (23)		
Patrón de anticuerpos			
<i>ANAs</i>	22 (100)		1 no realizado
<i>Anticentrómero</i>	11 (50)		
<i>SCL-70</i>	2 (9)		
<i>Anti-RO</i>	4 (17)		
<i>Hemoglobina (g/dL) *</i>	14,10 ± 1,19		
<i>Leucocitos (10⁹/L) *</i>	7,23 ± 2,58		
<i>Plaquetas (10⁹/L) *</i>	244,13 ± 53	287,75 ± 48,69	
<i>Plaquetocrito (%) *</i>	1,07	1,32	P=0,04
Afectación cardíaca	11 (46)		
Afectación gastrointestinal			
<i>Esofágica</i>	16 (65)		
<i>Estómago</i>	4 (17)		
<i>Colon</i>	3 (13)		
<i>Ano/recto</i>	1 (4)		
Afectación pulmonar			2 con HTP + EPID
<i>HTP</i>	5 (22)		
<i>EPID</i>	11 (46)		
Tratamiento			
<i>Calcio-antagonistas</i>	15 (65)		
<i>Ácido acetil salicílico</i>	8 (34)		

ANAs: anticuerpos antinucleares, ARA: antagonistas de los receptores de angiotensina, DLCO: capacidad de difusión pulmonar, DE: desviación estándar, EPID: enfermedad pulmonar intersticial, ES: esclerosis sistémica, FVC: capacidad vital forzada, HTP: hipertensión pulmonar, IECA's: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, sPAP: presión sistólica de la arteria pulmonar VSG: velocidad de eritrosedimentación. * Media ± DE.

2. Comparación de las concentraciones de factores de crecimiento y angiogénicos en PRP respecto a PPP

A continuación, se describen los resultados de los niveles de factores de crecimiento y angiogénicos tanto en PRP como en PPP en 39 muestras: 23 pacientes y 16 controles (**figura 3; tabla 6**).

a) TGF- β 1

El TGF- β 1 fue el factor más abundante tanto en PRP como en PPP, estando aproximadamente 12 veces más concentrado en PRP respecto a PPP (207.903,40 vs. 17.054,94 pg/mL; $P < 0,0001$) (**figura 4a**).

b) PDGF-BB

El PDGF-BB que se sabe es de los más abundantes en plaquetas, se encontraba 39 veces más concentrado en PRP respecto a PPP (260,85 vs. 6,62 pg/mL; $P < 0,0001$) (**figura 4b**).

c) VEGF-A

Respecto al VEGF-A, los resultados obtenidos demostraron una concentración 12 veces mayor en PRP respecto a PPP (372,45 vs. 29,17 pg/mL; $P < 0,001$) (**figura 4c**).

d) G-CSF

El G-CSF se encontró aproximadamente 20 veces más concentrado en PRP respecto a PPP (260,80 vs. 12,72 pg/mL; $P < 0,0001$) (**figura 4d**).

e) MCP-1

El MCP-1 se encontró discretamente más alto en PRP respecto a PPP (59,10 vs. 44,37 pg/mL; $P < 0,0001$) (**figura 4e**).

f) FGF-2

El FGF-2 se encontró aproximadamente 6 veces más concentrado en PRP respecto a PPP (17,90 vs. 2,95 pg/mL; $P < 0,0001$), siendo este factor el menos abundante tanto en PRP como en PPP (**figura 4f**).

g) HGF

También el HGF se encontró discretamente más alto en PRP respecto a PPP (95,90 vs. 68,97 pg/mL; $P < 0,0001$) (**figura 4g**).

h) Interleucinas

Las interleucinas fueron en general los analitos menos abundantes en PPP y PRP, aunque cabe destacar a la IL-1 β que alcanzó la mayor diferencia de concentración de todos los factores analizados en PRP respecto a PPP con una *ratio* de más de 50 ($P < 0,0001$). La IL-1 α se encontró casi 10 veces más

concentrada en el PRP ($P < 0,0001$), aunque los valores detectados fueron bajos, especialmente en PPP. La IL-6 presentó concentraciones más elevadas en PRP respecto a PPP en el orden de 5 ($P < 0,0001$). Aunque la comparativa entre PRP y PPP de los valores de IL-13 sí mostró diferencias significativas ($P = 0,001$), la diferencia fue discreta (1,28 veces) (**figura 5**).

Por último, en el caso de la IL-8, y del resto de factores analizados (histamina y serotonina), los valores de concentración encontrados fueron ligeramente más elevados en las muestras de PPP respecto a las muestras de PRP (las *ratios* fueron < 1) sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, estando además los niveles de concentración de IL-8 en los límites de detección del experimento (**tabla 6**).

Tabla 6. Valores de factores de crecimiento y angiogénicos en 39 muestras (23 pacientes con ES y 16 controles), tanto PPP como en PRP (valores normalizados por el plaquetocrito)

Factor	PPP [pg/mL]; Me (RIC)	PRP [pg/mL]; Me (RIC)	Ratio (PRP/PPP)	P
TGF- β	17.054,94 (59.110,86-30,02)	207.903,40 (59.8421,20-45.689,70)	12,19	$< 0,0001$
IL-1 β	2,14 (138,99-2,14)	109,90 (268,51-15,36)	51,36	$< 0,0001$
IL-6	7,45 (26,36-7,45)	36,33 (103,40-0,72)	4,88	$< 0,0001$
IL-8	2,42 (2,42-2,42)	2,18 (28,35-1,21)	0,90	0,75
IL-13	5,42 (6,11-5,42)	6,95 (15,79-2,72)	1,28	0,001
G-CSF	12,72 (214,37-12,72)	260,80 (674,67-57,16)	20,50	$< 0,0001$
HGF	68,97 (156,67-26,72)	95,90 (255,93-37,29)	1,39	$< 0,0001$
MCP-1	44,37 (205,61-9,99)	59,10 (226,86-17,35)	1,33	0,002
IL-1 α	0,71 (10,39-0,71)	6,95 (38,57-1,77)	9,79	$< 0,0001$
FGF-2	2,95 (2,95-2,95)	17,90 (99,64-1,48)	6,07	$< 0,0001$
VEGF-A	29,17 (84,93-5,76)	372,45 (1484,09-70,60)	12,77	$< 0,0001$
PDGF-BB	6,62 (17,65-6,62)	260,85 (1563,30-33,67)	39,40	$< 0,0001$
Histamina	77,48 (169,18-31,25)	64,18 (216,25-27,69)	0,83	0,49
Serotonina	6650,83 (15.705,08-2083,23)	6147,61(30955,45-1735,55)	0,92	0,87

FGF-2: factor de crecimiento derivado de fibroblastos, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, HGF: factor de crecimiento derivado de hepatocitos, IL: interleucina, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, pg/mL: picogramos/mililitro, PPP: fracción de plasma pobre en plaquetas, PRP: fracción de plasma enriquecido en plaquetas, TGF- β : factor de crecimiento transformador beta, VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A. Me: mediana, RIC: rango intercuartílico,

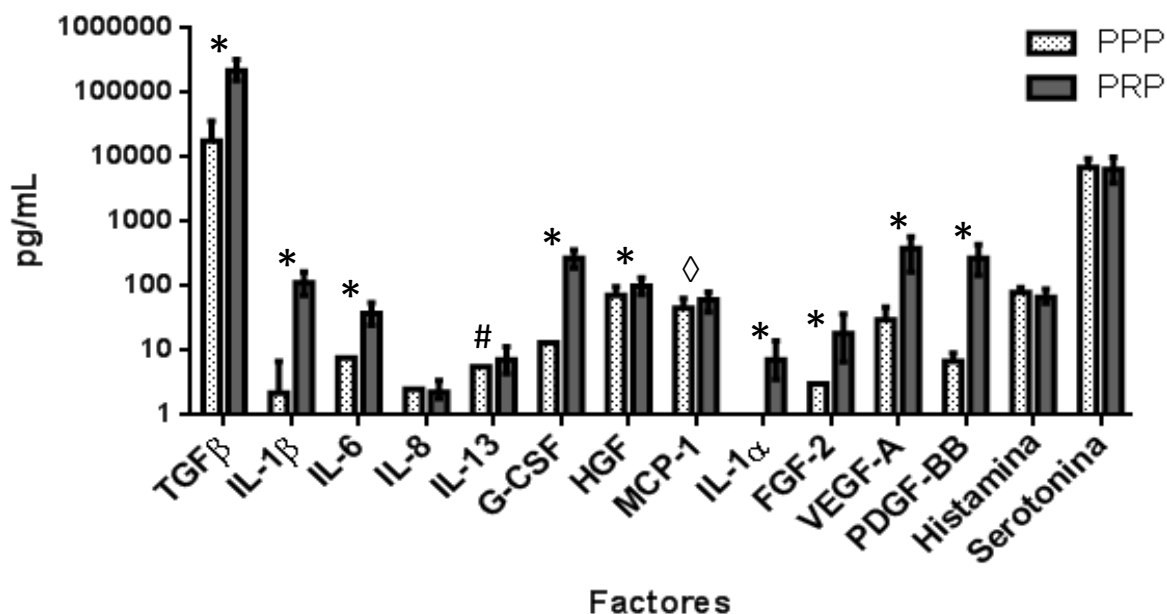


Figura 3. Comparativa de los niveles de factores e interleucinas entre muestras de PRP y PPP de 39 participantes (23 pacientes con ES y 16 controles). FGF-2: factor de crecimiento derivado de fibroblastos tipo 2, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, HGF: factor de crecimiento derivado de hepatocitos, IL: interleucina, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos, PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, pg/mL: picogramos/mililitro, PPP: fracción de plasma pobre en plaquetas, PRP: fracción de plasma enriquecido en plaquetas, TGF- β : factor de crecimiento transformador beta, VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A. * $P < 0,0001$; # $P = 0,001$; $\diamond P = 0,002$.

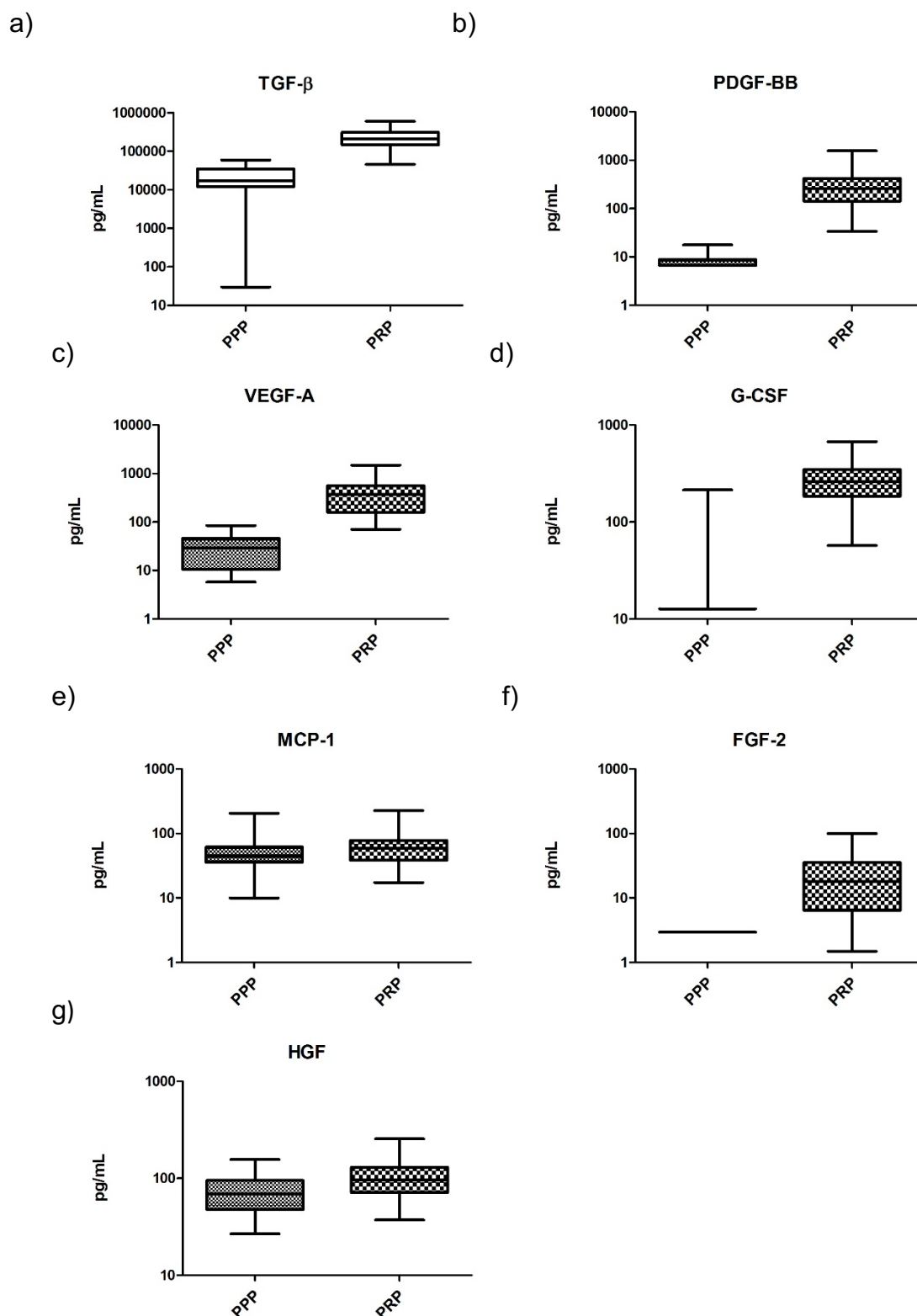


Figura 4. Comparación de los valores de factores en 39 muestras de PRP vs. PPP (23 pacientes y 16 controles): a) TGF β^* : factor de crecimiento transformador beta, b) PDGF-BB * : factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, c) VEGF-A * : factor de crecimiento endotelial vascular A, d) G-CSF * : factor estimulante de colonias de granulocitos, e) MCP-1 $^\diamond$: proteína quimiotáctica de monocitos, f) FGF-2 * : factor de crecimiento derivado de fibroblastos 2, g) HGF * : factor de crecimiento derivado de hepatocitos. * $P < 0,0001$; $^\diamond P = 0,002$.

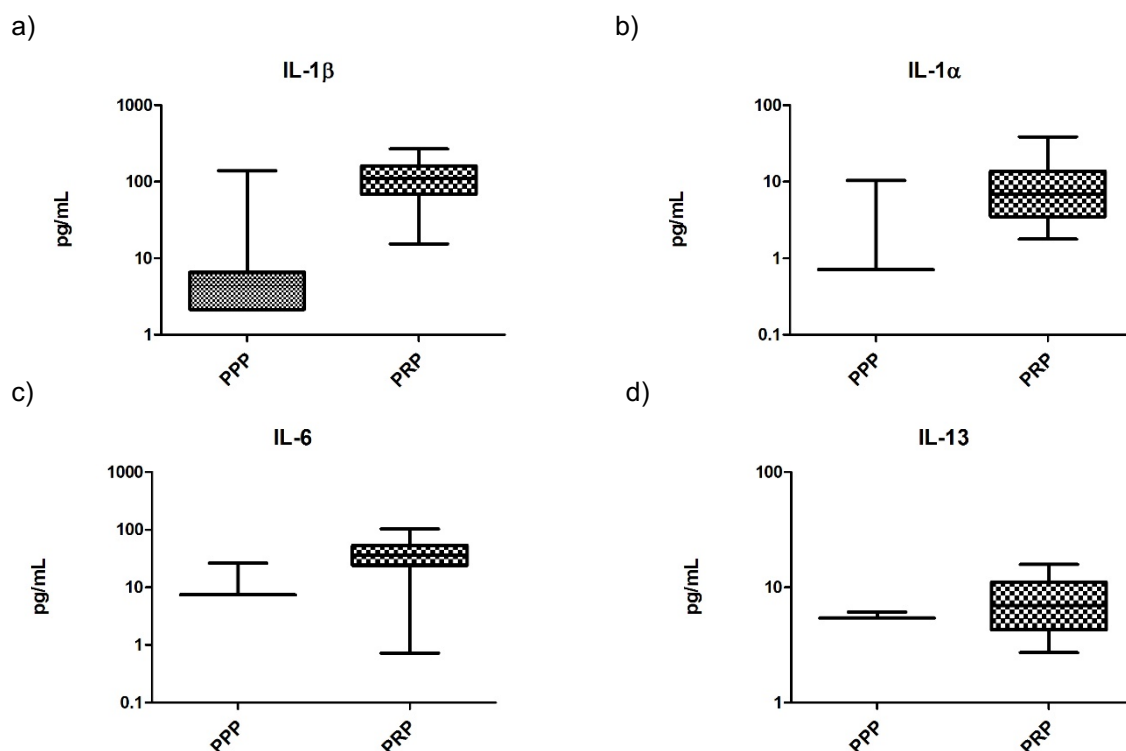


Figura 5. Comparación de los valores de IL analizadas en muestras de plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP) de 39 participantes (23 pacientes y 16 controles), a) IL-1 β *, b) IL-1 α *, c) IL-6*, d) IL-13#. * $P < 0,0001$; # $P = 0,001$.

3. Comparación entre grupos de pacientes y controles

Al comparar los resultados entre pacientes y controles no se encontraron diferencias significativas ni en muestras de PPP (**figura 6; tabla 7**) así como tampoco en muestras de PRP (**figura 7; tabla 8**) a excepción del VEGF-A el cual se encontraba tres veces menos concentrado en el PRP de pacientes (Me:193,10; RIC: 774,26-70,60 pg/mL); respecto al de controles (Me: 574,31; RIC:1.484,09-220,56 pg/mL) ($P < 0,0001$) (**figura 8**).

Tabla 7. Valores de factores de crecimiento y angiogénicos de PPP en pacientes con ES (n=23) y controles (n=16)

Factor	Controles [pg/mL]; Me (RIC)	Pacientes [pg/mL]; Me (RIC)	P
TGF β	19.748,16 (59.110,86-30,03)	15.882,96 (44.579,73-30,03)	ns
IL-1 β	2,31 (138.99-2,14)	2,14 (16,27-2,14)	ns
IL-6	7,45 (26.36-7.45)	7,45 (9,38-7,45)	ns
IL-8	2,42 (2.24-2,42)	2,42 (2,42-2,42)	ns
IL-13	5,42 (6,11-5,42)	5,42 (5,42-5,42)	ns
G-CSF	12,72 (214,37-12,72)	12,72 (39,49-12,72)	ns
HGF	62,03 (124,39-32,22)	76,03 (156,67-26,72)	ns
MCP-1	43,67 (147,74-9,99)	44,58 (205,61-21,78)	ns
IL-1 α	0,71 (10.39-0,71)	0,71 (3,64-0,71)	ns
FGF-2	2,95 (2.95-2,95)	2,95 (2,95-2,95)	ns
VEGF-A	32,96 (75,47-5,76)	29,17 (84,93-5,76)	ns
PDGF-BB	6,98 (14,04-6,62)	6,62 (17,65-6,62)	ns
Histamina	72,66 (95,33-48,27)	77,90 (169,18-31,25)	ns
Serotonina	7.341,39 (12.840,32-2.083,23)	5.826,98 (15.705,08-2.592,35)	ns

FGF-2: factor de crecimiento derivado de fibroblastos tipo 2, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, HGF: factor de crecimiento derivado de hepatocitos, IL: Interleucina, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos, PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, pg/mL: picogramos/mililitro, TGF- β : factor de crecimiento transformador beta, VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A. Me: Mediana; ns: No significativo, RIC: rango intercuartílico.

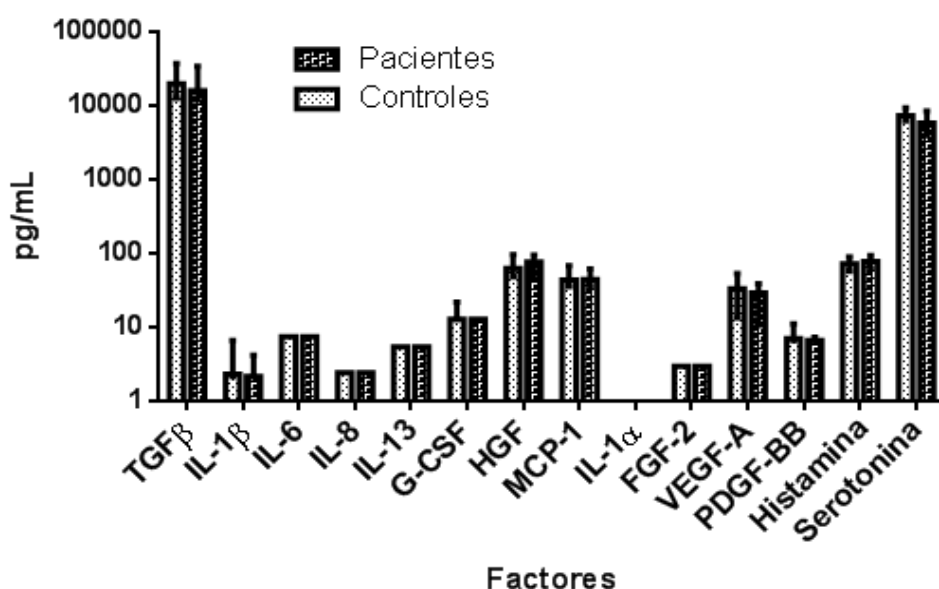
**Figura 6.** Comparativa de valores de factores en muestras de PPP entre pacientes (n=23) y controles (n=16). Se representan las Me (medianas) y RIC (rangos intercuartílicos). FGF-2: factor de crecimiento derivado de fibroblastos tipo 2, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, HGF: factor de crecimiento derivado de hepatocitos, IL: Interleucina, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos, PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, pg/mL: picogramos/mililitro, TGF- β : factor de crecimiento transformador beta, VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A.

Tabla 8. Valores de factores de crecimiento y angiogénicos de PRP en pacientes con ES (n=23) y controles (n=16)

Factor	Controles [pg/mL]; Me (RIC)	Pacientes [pg/mL]; Me (RIC)	P
TGFβ	23.4526,00(598.421,20-123.904,90)	179.142,50(585.774,80-45.689,70)	ns
IL-1β	130,75 (268,51-41,12)	96,57 (211,56-15,36)	ns
IL-6	35,99 (66,53-15,95)	36,33 (103,40-0,72)	ns
IL-8	1,90 (3,97-1,21)	2,24 (28,35-1,56)	ns
IL-13	6,94 (15,79-2,72)	7,53 (15,49-3,57)	ns
G-CSF	278,86 (479,04-107,83)	242,18 (674,67-57,16)	ns
HGF	96,53 (255,93-47,66)	89,68 (253,95-37,29)	ns
MCP-1	57,94 (156,81-17,35)	59,1 (226,86-21,79)	ns
IL-1α	7,09 (21,25-2,63)	6,08 (38,57-1,77)	ns
FGF-2	13,51 (88,59-1,48)	22,75 (99,64-2,14)	ns
VEGF-A*	574,31 (1484,09-220,56)	193,10 (774,26-70,60)	<0,0001
PDGF-BB	264,40 (1.563,30-57,85)	260,85 (618,69-33,67)	ns
Histamina	69,02 (105,05-35,07)	62,82 (216,25-27,69)	ns
Serotonina	6.414,63 (16.082,75-1.735,55)	5.341,07 (30.955,45-2.221,35)	ns

Abreviaturas: FGF-2: factor de crecimiento derivado de fibroblastos tipo 2, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, HGF: factor de crecimiento derivado de hepatocitos, IL: interleucina MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos, PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, pg/mL: picogramos/mililitro, TGF- β: factor de crecimiento transformador beta, VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A, Me: mediana; ns: No significativo, RIC: rango intercuartílico.

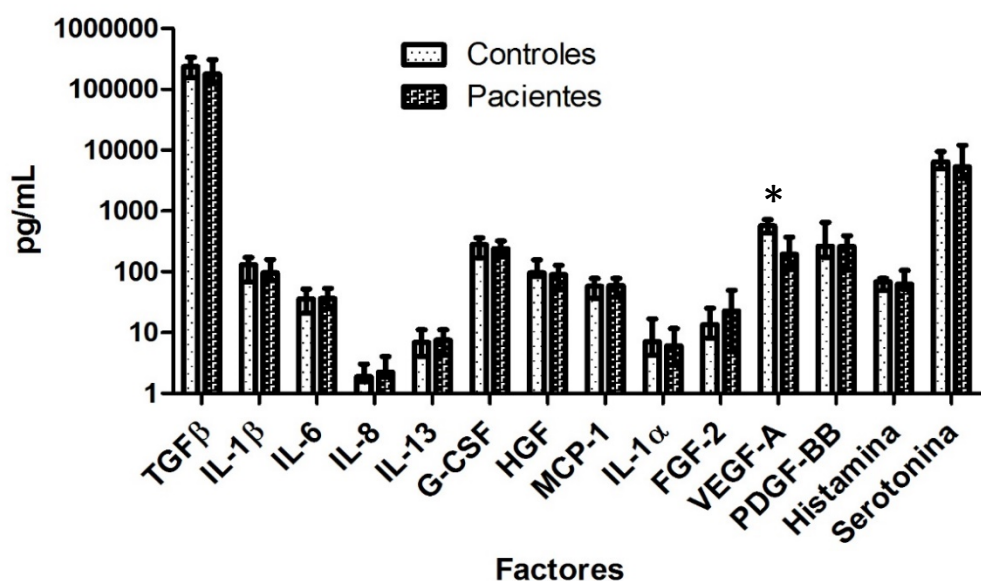


Figura 7. Comparativa da valores de factores en muestras de PRP entre pacientes (n=23) y controles (n=16). Se representan las Me (medianas) y RIC (rangos intercuartílicos). * $P < 0,0001$. FGF-2: factor de crecimiento derivado de fibroblastos tipo 2, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, HGF: factor de crecimiento derivado de hepatocitos, IL: Interleucina, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos, PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, pg/mL: picogramos/mililitro, TGF- β: factor de crecimiento transformador beta, VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A.

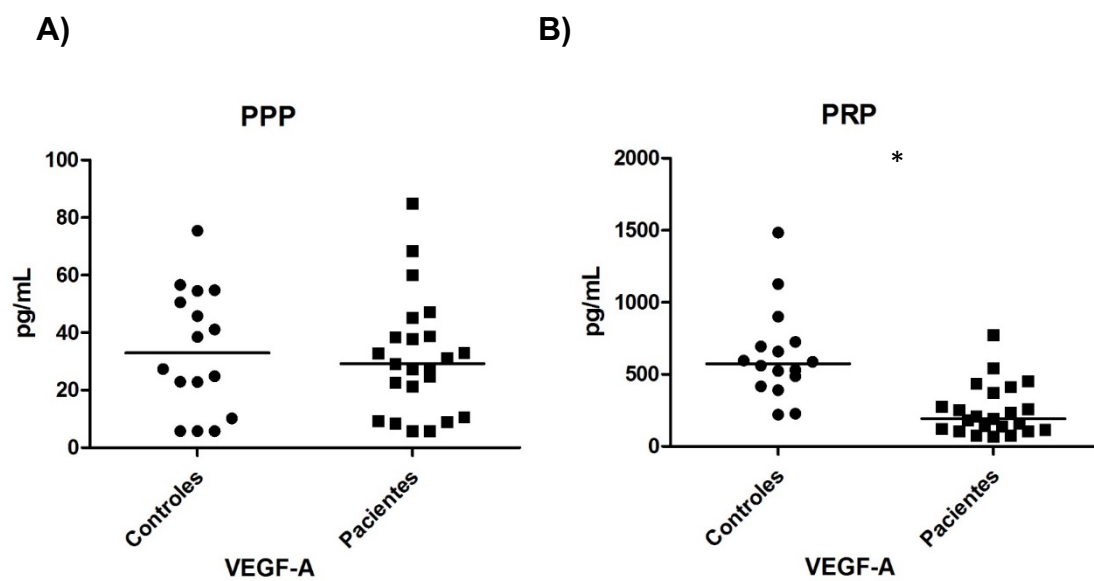


Figura 8. Valores de concentración (pg/mL) del factor VEGF-A en PPP (A) y en PRP (B) de pacientes (n=23) y controles (n=16). Se representan las Me (medianas). * $P < 0.0001$.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

En la ES, independientemente de la reducción de flujo sanguíneo y de la hipoxia tisular, no hay evidencia de una adecuada respuesta angiogénica ^(3,101). Esto se demuestra claramente por los hallazgos capilaroscópicos durante la evolución de la enfermedad donde se observan alteraciones estructurales tales como megacapilares, ramificaciones y en último término pérdida capilar ⁽¹⁰²⁾. Estas anomalías en la microvasculatura parecen estar relacionadas por una disfunción entre los diferentes factores angiogénicos y angiostáticos, así como de los FC, contribuyendo de esta manera al desarrollo de lesiones típicas ⁽¹⁰³⁾. Recientemente se han estudiado diversos factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos demostrando su papel en el desarrollo de esta enfermedad ⁽¹⁰⁴⁾.

Existe cada vez más evidencia de la existencia de niveles elevados de FC y angiogénicos en pacientes con ES tales como el VEGF-A, MCP-1, IL-1, IL-6 e IL-13 entre otros ^(90, 95-109). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios los FC se cuantifican en suero, el cual, por su manejo, puede presentar restos de lisados celulares de las diversas estirpes sanguíneas (que también contienen estos factores), pudiendo así, interferir en los resultados ⁽¹¹⁰⁾. Por esta razón en el presente trabajo se han medido los factores en plasma desleucocitado y sin hematíes con el fin de obtener datos más precisos.

En cuanto a las plaquetas, en las últimas décadas se ha descrito un aumento en su activación y liberación de contenido en pacientes con ES ⁽⁴⁴⁾. El papel de las plaquetas es fundamentalmente hemostático, sin embargo, por su tamaño pequeño y circulación permanente por el torrente sanguíneo se encuentran en contacto continuo con la pared endotelial ⁽¹⁾. Debido a lo anterior se ha postulado que podrían tener un papel relevante en la patogenia de la ES.

Como se ha descrito previamente, las plaquetas son una fuente rica en moléculas proangiogénicas tales como el VEGF, FGF, o el PDGF ⁽⁷⁶⁾. Estas moléculas compiten con factores antiangiogénicos liberados por otras células para mantener un balance. Sin embargo, en pacientes con ES parece no ocurrir de esa manera, conduciendo así a pérdida capilar y desregulación en los pequeños vasos tanto en forma como en tamaño. Todos estos datos en su conjunto han servido de argumento para la realización de la presente tesis doctoral en donde se han medido un total de 12 FC y angiogénicos no solo en plasma, sino, además, en el lisado plaquetario comparando los valores obtenidos en pacientes con ES respecto a controles. Es importante destacar el hecho que en los estudios realizados en PRP, los resultados no se encuentran normalizados por el volumen y tamaño plaquetario, esto es; el plaquetocrito ⁽¹¹⁰⁾. Hasta ahora, que se sepa, es la primera vez que se describen los valores de diversos FC intraplaquetarios de pacientes con ES normalizando las concentraciones obtenidas por el plaquetocrito. Así pues, se procede a discutir cada uno de los resultados.

1) Características clínicas y epidemiológicas:

Como se mencionó en el apartado de resultados, los grupos de pacientes y controles fueron homogéneos en cuanto a edad, sexo y parámetros sanguíneos.

Uno de los valores a destacar es que el 68% de los pacientes presentaban afectación pulmonar, un valor por encima de lo descrito en los registros de esta enfermedad que es en torno al 25%-57% ⁽¹¹¹⁾. La explicación de esta circunstancia es que inicialmente el proyecto se pretendía realizar únicamente en pacientes con ES y afectación pulmonar. Sin embargo, no se reclutó al número previsto de participantes. La rareza de la ES, los diversos subtipos y la variabilidad del curso de la enfermedad, constituyen un obstáculo para diseñar estudios con un número suficiente de pacientes y con una muestra homogénea. Lo anterior ha quedado reflejado por la variabilidad en los pacientes que se han reclutado principalmente en el apartado de duración de la enfermedad y tiempo hasta el diagnóstico ($48,9 \pm 74,60$ meses). En lo referente al consumo de tabaco, en el presente estudio más del 75% de los pacientes habían sido fumadores en algún momento de su vida, y un 22% lo eran en el momento de la entrevista clínica. A pesar de lo anterior, en la mayoría de estudios realizados investigando el tabaco como factor de riesgo para el desarrollo de ES no se ha encontrado una correlación positiva y es un aspecto que aún falta por dilucidar ⁽¹⁹⁾.

Con respecto al antecedente de úlceras digitales, en el presente estudio un 34% de los pacientes habían padecido en el transcurso de la enfermedad una o más úlceras digitales; este dato se asemeja al descrito en la literatura que es en torno al 31% ⁽¹¹¹⁾. Un dato discrepante es el hecho que 74% de los pacientes con ES presentaban la variante cutáneo-difusa, sin embargo, en el perfil de anticuerpos aproximadamente el 50% eran anticentrómero positivo (más propio de la ES cutáneo-limitada). La explicación más razonable es que los pacientes no pertenecen al mismo facultativo ni especialidad en sus seguimientos durante las visitas a consulta. Los pacientes con afectación esofágica fueron en torno del 66%, similar a lo descrito en la literatura que varía entre el 53-86% ⁽¹¹²⁾. Un tercio de los pacientes se encontraban en tratamiento con ácido acetil salicílico en el momento del estudio, siendo un aspecto preocupante de cara al efecto que éste tiene a nivel de la plaqueta. Por lo tanto, para no interferir en los resultados y previo acuerdo con los facultativos, se suspendió la toma de ácido acetil salicílico, una semana antes (vida media de la plaqueta) de la realización de la plaquetoféresis.

En resumen, la muestra estudiada era representativa (en la mayoría de los aspectos) respecto a lo que se conoce de la enfermedad hasta el momento.

Como se describió anteriormente se analizaron los niveles de factores de crecimiento e interleucinas según afectación órgano-específica (pulmonar, gastrointestinal, úlceras digitales), tipo de ES (limitada vs. difusa), tipo de patrón capilaroscópico (precoz vs. tardío), tipo de medicación (con antiagregantes plaquetarios vs. sin antiagregantes plaquetarios), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

2) Factores de crecimiento en PRP y PPP:

2.1 TGF- β

El factor más abundante tanto en plasma como en las plaquetas en el presente estudio fue el TGF- β , dato ya conocido debido a que el TGF- β es central en la fisiopatología de la ES ⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾. Sin embargo, es importante destacar, que las diferencias de los valores de TGF- β , no han diferido entre pacientes y controles tanto en PRP (179.142,50 pg/mL vs. 234.526,00 pg/mL) como en PPP (15.882,96 pg/mL vs. 19.748,16 pg/mL). Esto contrasta con múltiples estudios realizados en el suero de pacientes con ES en el que este factor se encuentra elevado respecto a controles ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾.

Lo anterior hace plantearse si realmente los valores de FC (en otros estudios) se encuentran elevados en el suero debido a la presencia de restos de lisados de otras estirpes celulares. En resumen, el TGF- β 1 se encontró aproximadamente 12 veces más concentrado en PRP respecto a PPP (207.903,40 pg/mL vs. 17.054,94 pg/mL; $P < 0,0001$) sin diferencias estadísticamente significativas de los valores entre pacientes y controles.

2.2 PDGF-BB

Respecto al PDGF-BB se observaron niveles elevados en PRP respecto a PPP (207.903,40 vs. 17.054,94; $P < 0,0001$), un resultado esperado al ser un factor que se encuentran en altas concentraciones en las plaquetas ⁽⁹¹⁾. Al igual que el TGF- β es interesante mencionar que los valores encontrados no han diferido entre controles y pacientes tanto en PRP (264,40 vs. 260,85) como en PPP (6,98 pg/mL vs. 6,62 pg/mL).

2.3 VEGF-A

En cuanto a la comparación entre pacientes y controles en el presente estudio, la única diferencia estadísticamente significativa se observó en el PRP, de forma

que los niveles de VEGF-A fueron menores en el PRP de pacientes respecto a los controles (193,10 pg/mL vs. 574,31 pg/mL; $P < 0,0001$).

El VEGF-A es una glucoproteína de 34-46 kDa que pertenece a una superfamilia de proteínas de estructura y funcionalidad relacionadas. Dentro de ella se encuentran además el VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PIGF). El VEGF se ha descrito como un agente regulador del angiogénesis ^(105, 119, 120).

Existen diversas isoformas del VEGF-A, siendo la isoforma VEGF-A_{165a} la más abundante. Por otro lado, existe una segunda familia de isoformas denominadas VEGF-A_{xxx}b, que tienen el mismo número de aminoácidos que las VEGF-A_{xxx}a, pero con una secuencia de aminoácidos alternativa en su dominio carboxiterminal. De entre estas isoformas de segundo orden la más ampliamente estudiada es la isoforma VEGF-A_{165b} ^(121,122). La mayoría de isoformas del VEGF-A tienen una función proangiogénica. Sin embargo, VEGF-A_{165b}, actúa fundamentalmente como molécula antiangiogénica, y se han demostrado niveles elevados de esta tanto en piel como en el suero de los pacientes con ES ^(123,124).

En vista de este resultado, habría que plantearse que la plaqueta como tal, presenta un déficit en la concentración del VEGF-A haciéndola menos efectiva en el proceso de angiogénesis y reparación tisular y por otro lado habría que cuestionarse qué proporción (*ratio*) del VEGF-A es antiangiogénico. Este hallazgo ya se ha demostrado por el grupo de Hirigoyen y cols. ⁽⁹²⁾, quienes observaron niveles de VEGF-A elevados en pacientes con ES respecto a controles y que además la *ratio* de VEGF-A_{165b}/VEGF-A intraplaquetario se encontraba elevada por el aumento de la isoforma antiangiogénica (**figura 9**).

Con el presente estudio no se puede esclarecer si la plaqueta está dotada de menor cantidad de VEGF-A desde su formación o si por alguna razón libera más VEGF-A al exterior. En los estudios en pacientes con ES tanto en sus fases iniciales como en estadios establecidos se ha observado un incremento de los niveles de VEGF-A. Aun así, en los hallazgos capilaroscópicos hay pérdida capilar; una explicación para ello es que existe un cambio en la isoforma, desde una variante proangiogénica VEGF-A_{165a} en la fase inicial a una antiangiogénica VEGF-A_{165b} en los estadios crónicos ⁽¹⁰⁵⁾.

También es importante destacar el hecho de que, a la vista de este resultado, aún existen varias preguntas por contestar y seguir ampliando la presente línea de investigación. Preguntas tales como: ¿qué porcentaje de valor del VEGF-A intraplaquetario corresponde a la isoforma antiangiogénica VEGF-A_{165b}?, ¿las plaquetas de pacientes con ES liberan mayores cantidades de VEGF-A al exterior comparadas con plaquetas controles? o, en última instancia, ¿las plaquetas por alguna razón tienen menor capacidad de almacenamiento de este factor?

Otra característica importante a discutir es el hecho que la mayoría de los pacientes del presente estudio cursaban con afectación pulmonar (fundamentalmente EPID). Es sabido que el VEGF interviene en la producción

de factor surfactante, así como en la angiogénesis a nivel pulmonar, además de aportar un mecanismo antiapoptótico para la supervivencia de las células epiteliales y vasculares, sugiriendo así una función de reparación posterior a un estímulo dañino⁽¹²⁵⁾. Se ha observado que tanto el bloqueo y la sobreexpresión de VEGF-A resultan en fenotipos enfisematosos en modelos preclínicos, sugiriendo así, un papel importante en la homeostasis pulmonar⁽¹²⁶⁾.

De forma adicional las funciones de angiogénesis y permeabilidad atribuidas inicialmente al VEGF son extremadamente limitadas en pulmones maduros⁽¹²⁶⁾.

Como se comentó previamente, el VEGF-A se encuentra sobreexpresado en el suero de los pacientes con ES, y aun así lo que prevalece es una angiogénesis disfuncional⁽¹²⁷⁾. En lo que respecta a los hallazgos de este estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de VEGF-A en el PPP de pacientes respecto al de controles (32,96 pg/mL vs. 29,17 pg/mL). Este resultado refuerza la idea de que es probable que los valores en suero no sean tan precisos como los valores que se obtienen en plasma desleucocitado y sin hematíes (como sí se ha realizado en el presente trabajo), ya que estas células y su potencial lisis en el proceso podrían contribuir a sobreestimar los niveles de dicho factor⁽¹¹⁰⁾.

2.4 FGF-2

Otro de los hallazgos llamativos del presente estudio fue el hecho de que los niveles de FGF-2 en la fracción de PRP se encontraron 6 veces más concentrados respecto a PPP (17,90 pg/mL vs. 2,95 pg/mL; $P < 0,0001$).

El FGF-2 es una proteína que ha demostrado actividad antifibrótica tanto en modelos animales como en humanos⁽¹²⁸⁾. El FGF-2 es pleiotrópico y sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en las diversas células del organismo. En los últimos años se ha demostrado la actividad antifibrótica de esta molécula por el papel que ejerce en los fibroblastos del tejido conectivo, así como en los miofibroblastos y sus progenitores⁽¹²⁸⁾.

No existe consenso en cuanto a los niveles de FGF-2 en pacientes con ES. Algunos investigadores han encontrado niveles elevados^(93,129), otros lo han encontrado sin cambios^(123,130), y por último algunos lo han encontrado disminuido⁽¹³¹⁾. En lo que respecta a los hallazgos del presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de FGF-2 de pacientes respecto a controles tanto en PRP (22,75 pg/mL vs. 13,51 pg/mL) como en PPP (2,95 pg/mL vs. 2,95 pg/mL).

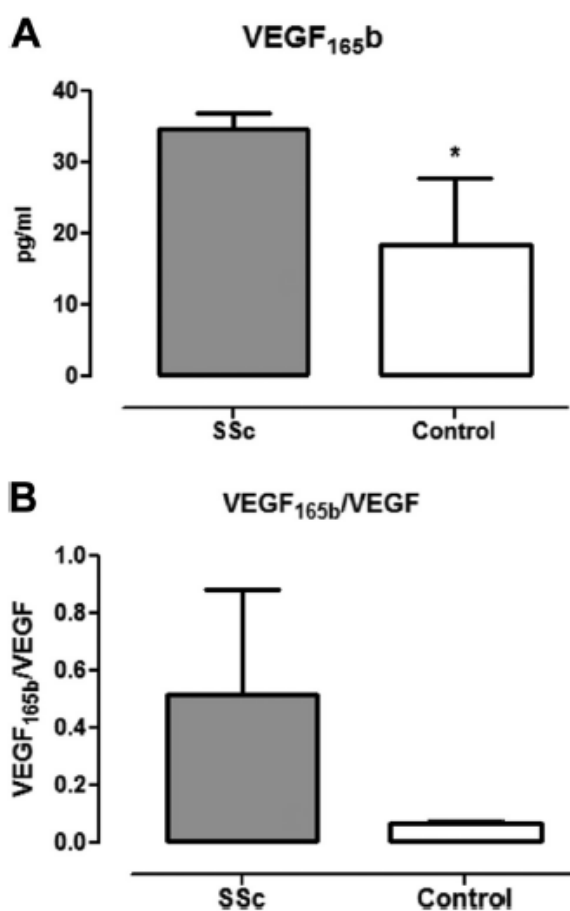


Figura 9: A.) Determinación en sobrenadantes de plaquetas de la isoforma antiangiogénica (VEGF-A 165_b). B.) Cociente VEGF-A_{165b}/VEGF total. (Hirigoyen D et al. *Arthritis Research & Therapy*. 2015; 17:332 ⁽⁹²⁾).

Por otro lado, hasta el día de hoy el FGF-2 no se había descrito como un factor abundante a nivel intraplaquetario ^(45,116). Sería interesante comparar los niveles de FGF-2 en plasma de pacientes con ES en fase inicial respecto a pacientes con ES avanzada y así estudiar la cinética que adopta este factor a lo largo del tiempo. Lamentablemente el número de pacientes en este estudio fue limitado para poder realizar esta comparación con suficiente potencia estadística. Se hace mención a esto ya que, inicialmente la enfermedad intenta “reparar” el daño produciendo cantidades mayores de factores de crecimiento y con los años esos mecanismos tienden a regularse ⁽¹³²⁾.

2.5 G-CSF

El nivel de G-CSF se encontró aproximadamente 20 veces más concentrado en PRP respecto a PPP (260,80 pg/mL vs. 12,72 pg/mL; $P < 0,0001$).

El G-CSF es una molécula polipeptídica que se produce en diferentes tejidos y que promueve la maduración de células precursoras de neutrófilos en la médula ósea ⁽¹³³⁾. Hasta ahora, no hay evidencia de que sea un factor abundante en la plaqueta.

Existe escasa literatura acerca de los niveles de G-CSF en pacientes con ES. Sin embargo, recientemente se ha comunicado que la concentración sérica de este factor está elevada en estos pacientes respecto a controles sanos ⁽¹³⁴⁾.

En pacientes con ES tratados con trasplante de médula ósea el G-CSF promueve la movilización de células madre hematopoyéticas CD34+ desde la médula ósea al torrente sanguíneo ⁽¹³⁵⁾.

Se ha demostrado además, que las inyecciones locales de células CD34+ obtenidas de sangre periférica movilizadas por el G-CSF tienen un efecto beneficioso en síntomas vasculares y cicatrización de úlceras en pacientes con ES ⁽¹³⁶⁾.

Por último, se ha descrito que el G-CSF tiene efectos terapéuticos en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina a través del reclutamiento de células madre mesenquimales medulares al tejido dañado vía SDF-1/CXCR4 ⁽¹³⁷⁾.

Más allá de su papel como un potente movilizador de células madre medulares, es sabido que el G-CSF participa en la reparación de tejidos mediante otras mecanismos que aún faltan por dilucidar ⁽¹³⁷⁾.

En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de G-CSF de pacientes respecto a controles tanto en PRP (278,86 pg/mL vs. 242,18 pg/mL) como en PPP (12,72 pg/mL vs. 12,72 pg/mL).

2.6 HGF

En lo que se refiere al HGF, se encontró más alto en PRP respecto a PPP (95,90 pg/mL vs. 68,97 pg/mL; $P < 0,0001$). Hasta ahora no existen estudios que evalúen los niveles intraplaquetarios del HGF en pacientes con ES.

El HGF es un factor antifibrótico que puede ayudar a reparar el daño tisular a través de la inhibición de la fibrosis y angiogénesis ⁽¹³⁸⁾. Una serie de estudios han puesto de manifiesto que el HGF suprime la fibrosis a través de la inhibición de la producción de colágeno, inducción de apoptosis de miofibroblastos y degradación de la matriz extracelular ^(138,139). Desde que se sabe que el HGF contrarresta varias de las acciones profibróticas del TGF- β , se ha propuesto que un balance entre estos dos factores puede ser decisivo en la patogénesis de la

ES. En ese sentido, pacientes con ES suelen tener niveles incrementados de HGF comparados con controles sanos; aun así, estos niveles son insuficientes para frenar el proceso fibrótico ⁽¹⁴⁰⁾. En contraste con lo anterior, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles de HGF en PPP de pacientes respecto a controles (76,03 pg/mL vs. 62,03 pg/mL).

En cuanto al pulmón se refiere, un estudio en una cohorte caucásica ha demostrado que los pacientes con ES tienen incrementados los valores de HGF en el lavado broncoalveolar ⁽¹⁴¹⁾. Una pregunta interesante por responder es saber si los niveles de HGF en pacientes con ES y afectación pulmonar difieren de los pacientes sin afectación pulmonar. En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en pacientes con afectación pulmonar vs. sin afectación pulmonar, aunque una vez más es preciso destacar que el número de pacientes del presente nuestro estudio fue limitado.

2.7 MCP-1

El valor de MCP-1 también se encontró discretamente incrementado en PRP respecto a PPP (59,10 pg/mL vs. 44,37 pg/mL; $P < 0,0001$).

La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1/CCL2), es un quimioatrayente de monocitos y células T, perteneciente a la superfamilia de las quimiocinas C-C, importantes para el reclutamiento y activación leucocitaria durante los procesos inflamatorios ⁽¹⁴²⁾.

Se ha demostrado la sobreexpresión de MCP-1 en pacientes con ES ⁽¹⁴⁰⁾. Los niveles en suero, así como la producción espontánea por las células mononucleares en pacientes con ES fueron elevados comparados con controles sanos; además dichos niveles se correlacionaron con la presencia de fibrosis pulmonar ⁽¹⁴³⁾. A pesar de lo anterior en el presente estudio los niveles de MCP-1 de pacientes con ES respecto a controles no mostraron diferencias estadísticamente significativas tanto en PRP (59,10 pg/mL vs. 54,97 pg/mL) como en PPP (44,58 pg/mL vs. 43,67 pg/mL).

En un estudio con 66 pacientes se encontraron niveles elevados de MCP-1 en aquellos que tenían afectación cutánea difusa, contracturas en flexión y fibrosis pulmonar ($P = 0,005$), también dichos niveles se correlacionaron con la severidad de la enfermedad ⁽¹⁰⁶⁾. Por último, también se ha demostrado que la ausencia del receptor CCR-2 específico del MCP-1 muestra un efecto protector para el desarrollo de fibrosis, y que el tratamiento con antagonistas de MCP-1 previene el desarrollo de fibrosis en piel en modelos animales ⁽¹⁴⁴⁾. Con lo anterior se pone de manifiesto el potencial papel que podría desarrollar MCP-1 en la fisiopatología de la enfermedad. En el presente trabajo de investigación no se encontraron diferencias significativas en los valores de MCP-1 de pacientes con EPID vs. aquellos sin EPID.

MCP-1 no tiene un efecto directo sobre los fibroblastos, ya que estas células carecen de dicho receptor ⁽¹⁴⁵⁾. Lo que realmente ocurre es que MCP-1 favorece

la diferenciación de IL-4 producida por las células T. La IL-4 soluble, a su vez induce la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos que residen en la dermis ⁽¹⁴⁵⁾. En el presente trabajo no se han medido los niveles de IL-4 lo que podría ser un aspecto interesante para investigar en próximos proyectos.

2.8 IL-1

Aunque las interleucinas fueron en general los analitos menos abundantes en PPP y PRP, es importante destacar a la IL-1 β que alcanzó la mayor diferencia de concentración de todos los factores analizados en PRP respecto a PPP, con una *ratio* superior a 50 ($P < 0,0001$). Por otro lado, La IL-1 α se encontró casi 10 veces más concentrada en el PRP respecto a PPP ($P < 0,0001$). Estas diferencias son interesantes ya que la IL-1 α y especialmente la IL-1 β no se han descrito como interleucinas abundantes a nivel intraplaquetario ⁽¹⁴⁶⁾.

En un estudio con 66 pacientes con ES y 19 controles se tomaron muestras de suero y se midieron los niveles de IL-1 α , encontrándolos significativamente más altos en pacientes respecto a controles ⁽¹⁰⁰⁾. No obstante, en el caso del presente estudio no se han podido detectar diferencias significativas en pacientes respecto a controles tanto en PRP (7,09 pg/mL vs. 6,08 pg/mL) como en PPP (0,71 pg/mL vs. 0,71 pg/mL).

La familia de la IL-1 está compuesta por 11 miembros (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37 e IL-38). Con la excepción de la IL-1Ra e IL-36Ra, cada una de ellas cuenta con su propio receptor. La IL-1 es una interleucina fundamentalmente proinflamatoria y profibrótica y se ha asociado a ES ⁽¹⁴⁷⁾. La IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra son llamadas colectivamente como IL-1 y su potencial papel en la fisiopatología de la ES se ha probado con su descubrimiento de manera cronológica.

La IL-1 α induce la producción de IL-6 y de PDGF, los cuales son estimuladores potentes de la producción de colágeno y de la proliferación de fibroblastos. Se ha observado que, al suprimir la IL-1, dicha inhibición conduce a la disminución de los niveles de IL-6 y de PDGF y, con ello, a la expresión de los fibroblastos en pacientes con ES ⁽⁹¹⁾. La IL-1 es clave en la regulación de la respuesta inmune ⁽⁹⁵⁾. También tiene un papel importante en la regulación del remodelado del tejido conectivo y la diferenciación de las células epiteliales y ectodérmicas ⁽¹⁴⁸⁾. Se ha observado que los fibroblastos de pacientes con ES producen de manera constitutiva IL-1 mientras que, en personas sanas, dicha producción solo ocurre tras una adecuada estimulación ⁽¹⁴⁹⁾.

2.9 IL-6

La IL-6 presentó concentraciones más elevadas en PRP respecto a PPP en el orden de 5 ($P < 0,0001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar los niveles en pacientes respecto a controles tanto en PRP (35,99 pg/mL vs. 33,36 pg/mL) como en PPP (7,46 pg/mL vs. 7,45 pg/mL).

Se sabe que tanto los niveles de IL-6 como del receptor soluble de IL-6 se encuentra elevados en pacientes con ES respecto a controles sanos ^(107, 108). En experimentos con animales portadores de ES-like, la patología fibrótica de piel y pulmones son IL-6 dependientes ⁽¹⁵⁰⁾. Lo anterior contrasta con los hallazgos del presente estudio ya que esas diferencias plasmadas en la literatura no han sido confirmadas. Si bien, la IL-6 no se encuentra en altas concentraciones a nivel intraplaquetario los hallazgos del presente estudio refuerzan la teoría de que no solo son células con un papel exclusivamente hemostático.

La IL-6 es una interleucina proinflamatoria y que, además, es central en la defensa del huésped. Adicionalmente, la IL-6 es esencial en el proceso de curación de las heridas, como así lo demuestran estudios de ratones *knockout* para IL-6, que, tras sufrir una lesión, su proceso de curación se ralentizaba con evidencia de atenuación del infiltrado leucocitario, reepitelización, angiogénesis y depósito de colágeno ⁽¹⁵¹⁾. Los mecanismos moleculares por los cuales se produce la ES no son bien conocidos. Sin embargo, se ha sugerido que la IL-6 juega un papel determinante en la fisiopatología de la enfermedad. Esto es debido a que se ha demostrado que los fibroblastos aislados y cultivados de la piel lesionada de pacientes con ES producen de manera constitutiva niveles más altos de IL-6 respecto a piel no lesionada de estos mismos pacientes ⁽¹⁵²⁾.

2.10 IL-8

La IL-8 es una citocina fundamentalmente quimiotáctica producida por múltiples células ⁽¹⁵³⁾. Poco es sabido acerca de su papel en los desórdenes del tejido conectivo. En un estudio incluyendo 24 pacientes con ES se observó aumento de sus valores respecto a controles sanos, asimismo, en este estudio se demostró la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra esta interleucina, esto hace pensar que pueda tener un papel en la fisiopatología de la enfermedad. Dentro de las células reclutadas por la función de la IL-8 se encuentran principalmente los neutrófilos y linfocitos T ⁽¹⁵³⁾.

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en PRP respecto a PPP (2,18 pg/mL vs. 2,18 pg/mL; $P = 0,75$) y tampoco se observaron diferencias en pacientes respecto a controles tanto en PRP (2,24 vs. 1,90) como en PPP (2,42 pg/mL vs. 2,42 pg/mL).

2.11 IL-13

Por último, se ha demostrado que la IL-13 interviene en la patogénesis de múltiples enfermedades fibróticas, incluyendo la ES ⁽¹⁵⁴⁾. Dentro de las actividades profibróticas de la IL-13 se encuentra la activación directa de los fibroblastos así como mecanismos indirectos a través de la estimulación del TGF- β ⁽¹⁵⁴⁾.

La IL-13 es una citocina inmunomoduladora secretada predominantemente por las células Th2. La IL-13 comparte algunas funciones con la IL-4 y ambas juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune mediada por citocinas del tipo 2 así como una contrarregulación de la respuesta inmune tipo 1 ⁽¹⁵⁵⁾. La IL-13 se une a dos cadenas primarias de receptor: IL-13R α 1 e IL-13R α 2. La IL-13R α 2 es el receptor funcional de la IL-13 y también reconoce a la IL-4, de ahí el solapamiento funcional entre ambas citocinas ⁽¹⁵⁵⁾.

La IL-13 estimula la producción de TGF- β por parte de los macrófagos a través de diversos mecanismos, siendo el más representativo la producción de TGF- β latente ⁽¹⁵⁶⁾. Independientemente de la función de señuelo del receptor IL-13R α 2, se ha demostrado recientemente que su estimulación prolongada en los procesos inflamatorios en presencia de TNF- α conduce a la producción de TGF- β por parte de los macrófagos y en última instancia fibrosis ⁽¹⁵⁶⁾.

Aunque la comparativa entre PRP y PPP de los valores de IL-13 sí mostró diferencias significativas ($P = 0,001$), esta fue muy leve, de 1,28 veces. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-13 de pacientes con ES respecto a los controles tanto es PRP (6,94 pg/mL vs. 7,53 pg/mL) como PPP (5,42 pg/mL vs. 5,45 pg/mL).

Todo esto contrasta con la literatura ya que en pacientes con ES se ha observado el aumento en sueros de diversas interleucinas, entre ellas la IL-13 ^(157,158).

2.12 Cuestiones finales y limitaciones del estudio

En resumen, las plaquetas se encuentran relacionadas de diversas formas al proceso de fibrosis, inflamación y angiogénesis. En el presente trabajo los valores intraplaquetarios de los FC, angiogénicos e interleucinas, TGF- β , VEGF-A, PDGF-BB, FGF2, HGF, MCP-1, G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-13 fueron mayores que los valores plasmáticos correspondientes, sin haber encontrado diferencias en los niveles IL-8, histamina o serotonina. En las comparaciones de los niveles de los factores entre pacientes con ES y controles, no se han encontrado diferencias significativas excepto en el caso del VEGF-A en las muestras de PRP, siendo los valores de este factor menores en pacientes respecto a controles.

Una de las aportaciones del presente trabajo ha sido la utilización (a nivel metodológico) del plaquetocrito para normalizar los resultados de los niveles de factores analizados, teniendo de esta forma en cuenta, además del número de plaquetas, el volumen plaquetario, debido a las diferencias obtenidas entre

pacientes y controles. Este aspecto empleado en el análisis de los datos obtenidos es altamente interesante ya que hasta ahora las publicaciones que hay sobre concentraciones de FC en PRP no están normalizadas lo que dificulta la comparación de los diferentes estudios.

En cuanto al aspecto metodológico cabe resaltar también la limitación que se ha tenido en la detección de algunos de los factores analizados que se encontraban cerca del límite de detección de los kits utilizados, como p. ej. el caso de la IL-8 en los que se podría optimizar la detección con la utilización de kits de alta sensibilidad.

Una de las limitaciones más importantes de este trabajo ha sido el tamaño muestral. Como ya se ha comentado, el número previsto de pacientes incluidos en el estudio fue discreto y esta situación no ha permitido hacer comparaciones de variables clínicas en el grupo de pacientes. El proceso de plaquetoféresis es un procedimiento invasivo y no está exento de riesgos y, esto constituye un punto importante a destacar a la hora del reclutamiento de los pacientes. Además de ser un proceso más costoso económicamente respecto a otros métodos de obtención de concentrados de plaquetas. No obstante, la utilización de este procedimiento ha permitido la obtención de muestras de lisado plaquetario de alta calidad y libre de contaminación de otros restos celulares que da un valor añadido para la obtención de resultados más específicos y fiables.

Por último, hay que destacar que sería interesante plantear estudios con una mayor participación de pacientes que permitiera validar estos resultados, además de explorar potenciales asociaciones de estos factores plaquetarios con variables clínicas en los pacientes con ES que contribuirían a esclarecer el papel de la plaqueta en la patogenia de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis doctoral han sido las siguientes:

1. Los niveles intraplaquetarios de los factores de crecimiento y angiogénicos TFG- β , VEGF-A, PDGF-BB, FGF2, HGF, MCP-1, G-CSF e interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-13 se encontraron significativamente elevados respecto a los niveles plasmáticos. No se encontraron diferencias en los niveles de histamina, serotonina ni IL-8.
2. Los niveles de los factores e interleucinas analizados (TFG- β , PDGF-BB, FGF2, HGF, MCP-1, G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13 histamina y serotonina) tanto intraplaquetarios como en plasma fueron similares en pacientes con ES comparados con controles.
3. Los niveles intraplaquetarios de VEGF-A fueron menores en los pacientes con ES comparativamente a controles, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$).

BIBLIOGRAFIA

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Medsger TA. Systemic sclerosis (scleroderma): clinical aspects. In: Koopman WJ, ed. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997: 1433-65.
2. Le Roy EC, Black C, Fleischmajer R, et. al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988; 15(2): 202-5.
3. Hunzelmann N, Krieg T. Scleroderma: from pathophysiology to novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol*. 2010; 19(5): 393-400.
4. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Inves*. 2007; 117(3): 557-67.
5. Acosta-Herrera M, López-Isaac E, Martín J. Towards a better classification and novel therapies based on the genetics of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2019; 21 (9): 44.
6. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 Classification criteria for systemic sclerosis: an-American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72(11): 1747-1755.
7. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeon CP, et al. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2014; 44(2): 208-219.
8. Tyndal AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(10): 1809-1815.
9. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE, et al. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum*. 1989; 32: 1362-1370.
10. Reveille JD. Ethnicity and race in systemic sclerosis: how it affects susceptibility, severity, antibody genetics, and clinical manifestations. *Curr Rheumatol Rep*. 2003; 5:160-7.
11. Wang J, Assassi S, Guo G, et al. Clinical and serological features of systemic sclerosis in a Chinese cohort. *Clin Rheumatol*. 2013; 32(5): 617-621.

12. Englert H, Small-McMahon J, Chambers P, et al. Familiar risk estimation in systemic sclerosis. *Aust N Z J Med*. 1999; 29:36-41.
13. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003; 48(8): 2246-2255.
14. Luo Y, Wang Y, Wang Q, et al. Systemic sclerosis: genetics and epigenetics. *J Autoimmun*. 2013; 41: 161-167.
15. Gladman DD, Kung TN, Siannis F, et al. HLA markers for susceptibility and expression in scleroderma. *J Rheumatol*. 2005; 32: 1481-1487.
16. Sing T, Jinnin M, Yamane K, et al. microRNA-92a expression in the sera and dermal fibroblasts increases in patients with scleroderma. *Rheumatology*. 2012; 51: 1550-1556.
17. Favalli E, Ingegnoli F, Zeni S, et al. HLA typing in systemic sclerosis. *Reumatismo*. 2001; 53: 210-214.
18. Rezaei R, Aslani S, Dashti N, et al. Genetic implications in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis*. 2018; 21: 1478–1486.
19. Abbot S, Bossingamm D, Proudmann S, et al. Risk factors for the development of systemic sclerosis: a systematic review of the literature. *Rheumatol Adv Pract*. 2018; 2(2): 1-12.
20. Sandusky SB, McGuire L, Smith MT, et al. Fatigue: an overlooked determinant of physical function in scleroderma. *Rheumatology*. 2009; 48(2): 165.
21. Allanore Y, Simms R, Distler O, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 15002.
22. Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum*. 2000; 43: 444.
23. Silver RM. Clinical aspects of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis*. 1991; 50 Suppl 4: 854-861.
24. Bowling J.C, Down P. Raynaud's disease. *Lancet*. 2003; 361: 2078.

25. Boin F, Wigley F. Understanding, assessing, and treating Raynaud's phenomenon. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17: 752-760.
26. Marie I, Dominique S, Levesque H, et al. Esophageal involvement and pulmonary manifestations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2001; 45: 346.
27. Akesson A, Wollheim FA. Organ manifestations in 100 patients with progressive systemic sclerosis: a comparison between the CREST syndrome and diffuse scleroderma. *Br J Rheumatol*. 1989; 28: 281.
28. Domsic RT, Nihtyanova SI, Wisniewski SR, et al. Derivation and validation of a prediction rule for two-year mortality in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66: 1616.
29. Lahcene M, Oumnia N, Matougui N, et al. Esophageal involvement in scleroderma: clinical, endoscopic, and manometric features. *ISRN Rheumatol*. 2011; 2011: 325826.
30. Kirby DF, Chatterjee S. Evaluation and management of gastrointestinal manifestations in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2014; 26: 621.
31. Parrado RH, Lemus HN, Coral-Alvarado PX, et al. Gastric antral vascular ectasia in systemic sclerosis: Current concepts. *Int J Rheumatol*. 2015; 2015: 762546.
32. Mesazaros WT. The colon in systemic sclerosis (scleroderma). *Am Roentgenol Radium Ther Nucl Med J*. 1959; 82: 100.
33. Hamel-Roy J, Devroede G, Arhan P, et al. Comparative esophageal and anorectal motility in scleroderma. *Gastroenterology*. 1985; 88: 1.
34. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine*. 2002; 81: 139.
35. Fischer A, Swigris JJ, Groshong SD, et al. Clinically significant interstitial lung disease in limited scleroderma: histopathology, clinical features, and survival. *Chest*. 2008; 134: 601.
36. Hax V, Bredemeier M, Didonet-Moro AL, et al. Clinical algorithms for the diagnosis and prognosis of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*. 2017; 47: 228.
37. Gladue H, Steen V, Allanore Y, et al. Combination of echocardiographic and pulmonary function test measures improves sensitivity for diagnosis of systemic

sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: analysis of 2 cohorts. *J Rheumatol* 2013; 40: 1706.

38. Occhipinti M, Bosello S, Sisti LG, et al. Quantitative and semi-quantitative computed tomography analysis of interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. A longitudinal evaluation of pulmonary parenchyma and vessels. *PLoS One*. 2019; 14 (3): e0213444.

39. D'Andrea A, Stanziola A, Di Palma E, et al. Right ventricular structure and function in Idiopathic pulmonary fibrosis with or without pulmonary hypertension. *Echocardiography*. 2016; 33: 57.

40. Meune C, Vignaux O, Kahan A, et al. Heart involvement in systemic sclerosis: evolving concept and diagnostic methodologies. *Arch Cardiovasc Dis* 2010; 103: 46.7.

41. Chu SY, Chen YJ, Liu CJ, et al. Increased risk of acute myocardial infarction in systemic sclerosis: a nationwide population-based study. *Am J Med*. 2013; 126: 982.

42. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66: 940.

43. Itälino JE, Hartwig J. Megakaryocyte development and platelet formation in: Michelso AD, editor. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002; pag 21-35.

44. Miller K, Dresner IG, Michael AF. Localization of platelet antigens in human kidney disease. *Kidney Int*. 1980; 18: 472-479.

45. Kahaleh MB, Osborn I, Leroy EC. Elevated levels of circulating platelet aggregates and beta-thromboglobulin in scleroderma. *Ann Intern Med*. 1982; 96: 610-613.

46. Belch JJ, O'Dowd A, Forbes CD, et al. Platelet sensitivity to a prostacyclin analogue in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol*. 1985; 24:346-350.

47. Collins CE, Rampton DS. Review article: platelets in inflammatory bowel disease—pathogenetic role and therapeutic implications. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997; 11: 237-247.

48. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 534-542.

49. Chapman LM, Aggrey AA, Field DJ, et al. Platelets present antigen in the context to MHC class I. *J Immunol*. 2012; 189: 916-923.

50. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: s17-24.
51. Hawrylowicz CM, Santoro SA, Platt FM, et al. Activated platelets express IL-1 activity. *J Immunol.* 1989; 143: 4015-4018.
52. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost.* 2008; 99: 480-486.
53. León-Ponte M, Ahern GP, O'Connell PJ. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood* 2007; 109: 3139-3146.
54. Yin J, Albert RH, Tretiakova AP, et al. 5HT-(1B) receptors play a prominent role in the proliferation of lymphocytes. *J euro immunol.* 2006; 181: 68-81.
55. Inoue M, Okazaki T, Kitazono T, et al. Regulation of antigen-specific CT Land Th1 cell activation through 5-Hydroxytryptamine 2A receptor. *Int Immuno pharmacol.* 2011; 11: 67-73.
56. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983; 258: 7155-7160.
57. Bachem MG, Melchior R, Gressner AM. The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycans entesis of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989; 27: 555-565.
58. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 255-273.
59. Gay S, Jones Jr, Huang GQ, et al. Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expresión in scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1989; 92: 301-303.
60. Ludwicka A, Ohba T, Trojanowska M, et al. Elevated levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor- β 1 in broncoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *J Rheumatol.* 1995; 22: 1876-1883.
61. Pandolfi A, Florita M, Altomare G, et al. Increased plasma levels of platelet-derived growth factor activity in patients with progressive systemic sclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1989; 191: 1-4.

62. Dees C, Akhmetshina A, Zerr P, et al. Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med*. 2011; 208: 961-972.
63. Druce M, Rockall A, Grossman AB. Fibrosis, and carcinoid syndrome: from causation to future therapy. *Nat Rev Endocrinol*. 2009; 5: 276-83.
64. Piguet PF, Vesin C. Pulmonary platelet trapping induced by bleomycin: correlation with fibrosis and involvement of the beta-2integrins. *Int J Exp Pathol*. 1994; 75: 321-8.
65. Kahlson G, Rosengren E. New Approaches to the physiology of histamine. *Physiol Rev*. 1968; 48 (1): 155-196.
66. Vera ES, Cricco GP, Engel NI, et al. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol*. 2000; 10: 15-23.
67. Buckley M.G. Walters C, Wong WM, et al. Mast cell activation in arthritis: detection of alpha and beta tryptase, histamine and eosinophilic cation protein in synovial fluid. *Clin Sci*. 1997; 93: 363-370.
68. Falana V, Soter NA, Altman RD, et al. Elevated plasma histamine levels in systemic sclerosis. *Arch Dermatol*. 1990; 126 (3): 336-338.
69. Nakonechnicov S, Gabbasov Z, Popov E, et al. Platelet aggregation in patients with primary pulmonary hypertension. *Blood Coagul Fibrinol*. 1996; 7: 225-227.
70. Schulman LL, Grossman BA, Owen J. Platelet activation and fibrinopeptide formation in pulmonary hypertension. *Chest*. 1993; 104: 1690-1693.
71. Hervé P, Launay J-M, Scrobohaci M, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 1995; 99: 249-254.
72. Nadaud S, Poirier O, Girerd B, et al. Small platelet microparticle levels are increased in pulmonary arterial hypertension. *Eur J Clin Invest*. 2013; 43: 64-71.
73. Kornerup KN, Page CP. The role of platelets in the pathophysiology of asthma. *Platelets*. 2007;18(5): 319-328.
74. O'Sullivan BP, Michelson AD. The inflammatory role of platelets in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173(5): 483-490.
75. Nash GF, Turner LF, Scully MF, et al. Platelets and cancer. *Lancet Oncol*. 2002; 3(7): 425-430.

76. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(9): 1897-1905.
77. Nadaud S, Poirier O, Girerd B, et al. Small platelet microparticle levels are increased in pulmonary arterial hypertension. *Eur J. Clin. Invest.* 2013; 43: 64-71.
78. Frayha RA, Shulman LE, Stevens MB. Hematological abnormalities in scleroderma. A study of 180 cases. *Acta Haematol.* 1980; 64(1): 25-30.
79. Wilkinson D, Vowden P, Gilks L, et al. Plasma eicosanoids, platelet function and cold sensitivity. *Br J Surg.* 1989; 76(4): 401-405.
80. Cuenca R, Fernández-Cortijo J, Lima J, et al. Platelet function study in primary Raynaud's phenomenon and Raynaud's phenomenon associated with scleroderma. *Med Clin.* 1990; 95(20): 761-763.
81. Lau CS, McLaren M, Saniabadi A, et al. Increased whole blood platelet aggregation in patients with Raynaud's phenomenon with or without systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol.* 1993; 22(3): 97-101.
82. Hutton RA, Mikhailidis DP, Bernstein RM, et al. Assessment of platelet function in patients with Raynaud's syndrome. *J Clin Pathol.* 1984; 37(2): 182-187.
83. Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Klama K, et al. Blood serum levels of amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide in patients with systemic sclerosis. *Connect Tissue Res.* 2010; 51(2): 83-87.
84. Blann AD, Constans J, Carpentier P, et al. Soluble P selectin in systemic sclerosis: Relationship with von Willebrand factor, autoantibodies and diffuse or localized/limited disease. *Thromb Res.* 2003; 109(4): 203-206.
85. Sfrikakis PP, Charalambopoulos D, Vaiopoulos G, et al. Circulating P- and L-selectin and T-lymphocyte activation and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Rheumatol.* 1999;18(1): 28-32.
86. Iannone F, Riccardi MT, Guiducci S, et al. Bosentan regulates the expression of adhesion molecules on circulating T cells and serum soluble adhesion molecules in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(8): 1121-1126.
87. Agache I, Radoi M, Duca L. Platelet activation in patients with systemic scleroderma. Pattern and significance. *Rom J Intern Med.* 2007;45 (2):183-91.

88. Young V, Ho M, Vosper H, et al. Elevated expression of the genes encoding TNF-alpha and thromboxane synthase in leucocytes from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2002; (8): 869-875.
89. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med*. 2018; 62: 44-62.
90. Maekawa T, Jinnin M, Ohtsuki M et al. Serum levels of interleukin-1 alpha in patients with systemic scleroderma. *Journal of Dermatology*. 2013; 40: 98-101.
91. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM, Endogenous IL-1 alpha from systemic IL-6 and PDGF-A. *Journal of Clinical Investigation*. 1999; 103: 1253-1260.
92. Hirigoyen D, Burgos PI, Mezzano V, et al. Inhibition of angiogenesis by platelets in systemic sclerosis system. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17: 332.
93. Shirari Y, Okazaki Y, Inoue Y, et al. Elevated levels of pentraxin-3 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2015; 67: 498-507.
94. Postiglione P, Ladogana P, Montagnani S, et al. Effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor on extracellular matrix deposition by dermal fibroblasts from patients with scleroderma. *J Rheumatol*. 2005; 32: 656-664.
95. Maekawa T, Jinnin M, Ohtsuki M, et al. Serum levels of interleukin 1-alpha with systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2013; 40: 98-101.
96. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi YK et al. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol*. 2006; 33(2): 275-284.
97. Gabirelli A, et al. Scleroderma. Mechanisms of disease. *NEJM*. 2009; 360: 1989-2003.
98. Cutolo M, Pizzorni C, Tuccio M, et al. Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2004; 43(6): 719-26.
99. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005; 18: 1440-63.

100. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord*. 2017; 2(1): 11–18.
101. Le Roy EC: Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am*. 1996; 22: 675-94.
102. Maricq HR. Wide field capillary microscopy: *Arthritis Rheum*. 1981; 24(9): 1159-1165.
103. Hummers LK, Hall A, Wigley FM, et al. Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma. *J Rheumatol*. 2009; 36: 576-82.
104. Mulligan-Keho MJ, Simons M: Current concepts in normal and defective angiogenesis: implication for systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2007; 9: 173-9.
105. Barratt SL, Flower VA, Pauling JD, et al. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and fibrotic lung disease. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 1269.
106. Yalçinkaya Y, çinar S, Artim-Esen B, et al. The relationship between biomarkers and disease characteristics in systemic sclerosis: elevated MCP-1 is predominantly associated with fibrotic manifestations. *Clin Exp Rheumatol*. 2016; 34: S110-S114.
107. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interlukin-1, Interlukin-2, Interlukin-4, Interleukin-6, TNF alpha, Interferon gamma levels in sera from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1992; 35 (1): 67-72.
108. Hasegawa M, Sato S, Ihn H, et al. Enhanced production of IL-6, Oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology*. 1999; 38: 612-617.
109. Almanzar G, Schmalzing M, Klein M, et al. Memory CD4+ T cells lacking expresión of CCR7 promote pro-inflammatory cytokine production in patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Eur J Dermatol*. 2019; 29(5): 468-476.
110. Bueno JL, Garcia F, Castro E, et al. A randomized crossover trial comparing three plateletpheresis machines. *Transfusion*. 2005; 45:1373–1381.
111. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, et al. The registry of the German Network for systemic scleroderma: frequency of disease subsets and patters of organ involvement. *Rheumatology*. 2008 (8); 47: 1185-1192.
112. Desbois AC, Cacoub P. Systemic sclerosis: An update in 2016. *Autoimmun Rev*. 2016; 15: 417-426.

113. Song QH, Klepeis VE, Nugent MA, et al. TGF- β regulates FGF2 mRNA expression during fibroblasts wound healing. *Mol Pathol.* 2002; 55: 164-176.
114. Lu J, Liu Q, Wang L. Increased expression of latent TGF- β binding protein 4 affects the fibrotic process in scleroderma by TGF- β /SMAD signaling. *Lab Invest.* 2017; 97 (5): 591-601.
115. Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, et al. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 334-344.
116. Pinedo HM, Verheul HM, De Amato W, et al. Involvement of platelets in tumor angiogenesis? *Lancet.* 1998; 352; 1775-1777.
117. De Santis M, Ceribelli A, Cavaciocchi F, et al. Nailfold videocapillaroscopy and serum VEGF levels in scleroderma are associated with internal organ involvement. *Auto immun Highlights.* 2016; 7: 5.
118. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18:816-827.
119. Ferrara, N, Gerger HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; 9: 669–676.
120. Bates D.O. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc. Res.* 2010; 87(2): 262-271.
121. Bates D.O, Cui T.G. Doughty J.M, et al. VEGF_{165b}, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is downregulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62: 4123-4131.
122. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, et al. VEGF_{165b}, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: Mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 2004; 64: 7822-7835.
123. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res.* 2002; 4: R11.
124. Manetti M, Guiducci S, Romano E, et al. Overexpression of VEGF_{165b}, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res.* 2011;109: e14-26.

125. Galambos C, Ng YS, Ali A. et al. Defective pulmonary development in the absence of heparin-binding vascular endothelial growth factor isoforms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 27: 194-203.
126. Bhandari V, Chho-Wing R, Chapoval SP, et al. Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006; 103: 11021-11026.
127. Chora I, Romano E, Manetti M, et al. Evidence for derangement of the microvascular systemic patients with a very early diagnosis of systemic sclerosis. *J Reumatol.* 2017; 44(8): 1190-1197.
128. Dolivo DM, Larson SA, Dominko T. Fibroblast growth factor 2 as antifibrotic: antagonism of myofibroblast differentiation and suppression of pro-fibrotic gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017; 38: 49-58.
129. Kadono T, Kikuchi K, Kubo M, et al. Serum concentrations of basic FGF-2 in collagen diseases. *J Am Acad Dermatol.* 1996; 35: 392-397.
130. Takehara K, Soma Y, Igarahi A, et al. Response of scleroderma fibroblasts to various growth factors. *Arch Dermatol Res.* 1991; 283(7): 461-464.
131. Ilgen U, Enes Yayla M, Düzgün N. Low serum fibroblast growth factor 2 levels not accompanied by increased serum pentraxin 3 levels in patient with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2017; 36: 367-372.
132. Shi HX, Lin C, Lin BB et al. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One.* 2013; 8(4): e59966.
133. Basu S, Dunn A, Ward A. G-CSF: function and modes of action (review). *Int J Mol Med.* 2002; 10(1): 3-10.
134. Becvar R, Storkanova H, Sumova B, et al. ABO635 Potential biomarkers of skin changes in Systemic Sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2019; 78: 1779.
135. Sullivan KM, Shah A, Sarantopoulos S, et al. Stem cell Transplantation for Scleroderma: Effective Immunomodulatory Therapy for Patients with Pulmonary Involvement. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68 (1): 2361-2371.
136. Del Papa N, Pignataro F. The role of Endothelial Progenitors in the Repair of Vascular Damage in Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2018; 9: 1383.
137. Zhao F, Cheng T, Yang L, et al. G-CSF Inhibits Pulmonary fibrosis by promoting BMSC homing to the lungs via SDF-1/CXCR4 Chemotaxis. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 10515.

138. Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M, et al. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2002; 29: 1877-1883.
139. Mizuno S, Matsumoto K, Li MY, et al. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J* 2005; 19: 580-582.
140. Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M. Increased levels of hepatocyte growth factor in sera of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1999; 26: 1012-1013.
141. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Higjland KB, et al. Impairment of antifibrotic effect of hepatocyte growth factor in lung fibroblasts from African Americans. *Arthritis Rheum*. 2007; 56: 2432-42.
142. Yamamoto T. Pathogenic role of CCL2/MCP-1 in scleroderma. *Front Bioscience*. 2008; 13: 2686-95.
143. Hasegawa MS, Takehara K. Augmentation of production of chemokine (MCP-1) in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 1999; 117: 159-165.
144. Moore BB, Paine R, Christensen PJ, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol*. 2001; 167: 4368-4377.
145. Distler JH, Jungel A, Caretto D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 214-225.
146. Pstlethwaite AR, Chiang TM. Platelet contribution to the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumat*. 2007; 19: 574-579.
147. Zhang L, Yan JW, Wang YJ, et al. Association of Interleukin 1 family with systemic sclerosis. *Inflammation*. 2014; 37 (4): 1213-1220.
148. Dinarello CA. Biologic Basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996; 87: 2095-2147.
149. Kawaguchi Y. IL-1- α gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 1994; 97: 445-450.

150. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa K, et al. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis and Rheum.* 2011; 63: 3575-3585.
151. Lin Z-Q, Kondo T, Ishida Y, et al. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6 deficient mice. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 713-721.
152. Feghali CA, BostvKL, Boulware DW, et al. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma: overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol.* 1992; 19(8): 1207–1211.
153. Reitamo S, Remitz A, Varga J, et al. Demonstration of interleukin 8 and autoantibodies to interleukin-8 in the serum of patients with systemic sclerosis and related disorders. *Arch Dermatol.* 1993; 129: 189-193.
154. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, et al. Interleukin- 13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001; 194: 809-821.
155. Wills-Karp M, Finkelman FD. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13- mediated signaling pathways. *Sci. Signal.* 2008;1:pe55.
156. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, et al. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat. Med.* 2006; 12 :99-106.
157. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi, et al. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1997; 24: 328-332.
158. Sekiguchi A, Motegi SI, Fujiwara. Inhibitory Effect of kaempferol on skin fibrosis in systemic sclerosis by the suppression of oxidative stress. *J Dermatol Sci.* 2019; 96 (1): 8-17.

ANEXOS

IX. ANEXOS

APORTACIONES CIENTIFICAS

Contribución científica:

Ponencia de resultados parciales en el XXII congreso de la Sociedad de Reumatología de la Comunidad de Madrid (SORCOM)



Póster presentado en el congreso de Sociedad Española de Reumatología (SER), Madrid 2019.

P141. BIOMARCADORES ANGIOGENICOS Y DE CRECIMIENTO INTRAPLAQUETARIOS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTÉMICA

B.J. Flores Robles¹, M.A. Sánchez², J.L. Bueno Gil³,
J. Mulero Mendoza¹, L. Núñez Martín-Buitrago³, H. Godoy Tundidor¹,
V. Pinillos Aransay⁴, E. Labrador Sánchez⁴, L. Merino Meléndez⁴,
Á. Elena Ibáñez⁴, J.A. López Martín⁴, E. Ramalle Gómara⁵
y J.L. Andréu Sánchez¹

¹Servicio de Reumatología; ²Instituto de Investigación de Biología Molecular; ³Servicio de Hematología. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid. ⁴Servicio de Reumatología. Hospital San Pedro. Logroño. ⁵Departamento de Estadística del Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR). Logroño.

Reumatol Clin. 2019;15 (Espec Cong): 31-203.

Póster presentado en el congreso EULAR Madrid 2019

AB0203

INTRAPLATELET ANGIOGENIC AND GROWTH FACTORS IN SYSTEMIC SCLEROSIS

Bryan-Josué Flores Robles¹, María-Alejandra Sánchez², José Luís Bueno Cabrera², Lucía Nuñez Martín-Buitrago², Cristina Gómez Casado³, Juan Mulero Mendoza², Hilda Godoy², Valvanera Pinillos¹, EztiZen Labrador-Sánchez¹, Juan Antonio López-Martín¹, Angel Elena-Ibáñez¹, Leticia Merino-Meléndez¹, José Luis Andréu Sánchez². ¹Hospital San Pedro, Logroño, La Rioja, Spain; ²Puerta de Hierro Hospital, Madrid, Spain; ³Institute of Applied Molecular Medicine (IMMA) San Pablo-CEU University Madrid, Molecular Medicine, Madrid, Spain

Background: Systemic sclerosis (SE) is a serious disease of the connective tissue characterized by dysfunction of the microcirculation. Angiogenesis is a complex process regulated by both angiogenic and angiostatic factors. Normally the functions of these factors are under an adequate balance, however, under certain conditions these factors can be induced initiating disorganized angiogenic phenomena.

Objectives: For the first time, the levels of intraplatelet growth and angiogenic factors (normalized by platelet number and volumen) are described in patients with systemic sclerosis.

Methods: We included 23 patients with systemic sclerosis (ACR/EULAR) and 16 controls. Patients underwent a platelet-apheresis to obtain platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP). The samples were subjected to a freeze-thaw process to break the cell membranes and release the platelet content. Subsequently the various factors were measured (VEGF- α , PDGF $\beta\beta$, HGF, FGF2, G-CSF, MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-13). Finally, the results were normalized according to the value of the plaquetocrit (number and volumen of platelets). We compared the levels in platelet-rich plasma and in platelet-poor plasma. A cut-off value $p < 0.05$.

Results: The mean age of the patients was 52 years \pm 9.71, with a duration of the disease of 8 years, 74% were patients with limited SE, 70% of the patients had pulmonary involvement. Both patients and controls, the TGF- β was 12 times more concentrated in PRP than in PPP ($p < 0.0001$), IL-1 β 13 times more ($p < 0.0001$), IL-6 10 times more ($p < 0.0001$), G-CSF 11 times more ($p < 0.0001$), VEGF- α more concentrated (11.6 times) $p < 0.005$. When the PRP of the patients with scleroderma was compared with the PRP of the controls, only differences were found in the VEGF concentrations, being decreased in the patients with scleroderma respect to controls ($p < 0.0001$). Table 1 and 2.

Conclusion: The levels of VEGF- α (intraplatelet) are lower in patients with SE vrs controls ($p < 0.0001$). The intraplatelet values of the growth and angiogenic factors are higher than the plasma (patients and controls), finally, the plasma levels of these factors are similar in patients compared with controls. In almost all studies until today the measured levels have been carried out in serum, which are not precise since, in serum, several cells and lysate residues can alter the values, therefore, quantification in plasma is important. The present work is the result of the doctoral thesis of the main author.

Artículos publicados durante el período de realización del doctorado.

Clinical Case Report



OPEN

Sialodochitis fibrinosa (kussmaul disease) report of 3 cases and literature review

Bryan Josue Flores Robles, MD^{a,*}, Beatriz Brea Álvarez, MD-PhD^b, Abel Alejandro Sanabria Sanchinel, MD^c, Robert Francis Andrus, MD^d, María Espinosa Malpartida, MD^a, Consuelo Ramos Giráldez, MD^a, Ana Lerma Verdejo, MD^e, Carolina Merino Argumanez, MD^a, Jose Antonio Pérez Pimiento, MD^f, Camen Bellas Menéndez, MD-PhD^g, Luis Fernando Villa Alcázar, MD^a, José Luis Andréu Sánchez, MD-PhD^a, Mercedes Jiménez Palop, MD^a, Hildegarda Godoy Tundidor, MD^a, José Campos Esteban, MD^a, Jesús Sanz Sanz, MD^a, Carmen Barbadillo Mateos, MD^a, Carlos María Isasi Zaragoza, MD^a, Juan Bartolomé Mulero Mendoza, MD-PhD^a

Abstract

Background: Sialodochitis fibrinosa is a rare disease which is characterized by recurring episodes of pain and swelling of the salivary glands due to the formation of mucofibrinous plugs. Analytic studies ascertain elevated levels of eosinophils and immunoglobulin E (IgE). Imaging studies such as magnetic resonance imaging (MRI) and sialography reveal dilation of the main salivary duct (duct ectasia). Treatment is initially supportive, consisting of compressive massages, and use of antihistamines and/or corticosteroids.

Material and methods: In the following, 3 cases of sialodochitis fibrinosa are presented which were diagnosed in a third level hospital during the period of 2008 and 2016, as well as a literature review of all cases reported to our knowledge.

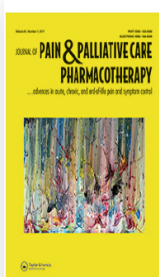
Results: Of the 41 cases found, including the 3 of this article, 66% were women with an average age of 45 years old. However, 75% of reported cases were of Japanese heritage. Involvement of the parotid glands was more frequent than the submandibular glands. In more than half of all cases treatment with compressive massages, antihistamines and/or corticosteroids was effective.

Conclusion: Clinicians should consider sialodochitis fibrinosa as a diagnostic possibility when presented with cases of recurring parotid and submandibular gland tumescence.

Abbreviations: ACE = angiotensin-converting enzyme, ACPA = anticitrullinated protein antibody, ANA = antinuclear antibody, ANCA = antinutrophil cytoplasmic antibody, CBC = complete blood count, CRP = C-reactive protein, ESR = erythrocyte sedimentation rate, HBV = hepatitis B virus, HCV = hepatitis C virus, HIV = human immunodeficiency virus, IgE = immunoglobulin E, MRI = magnetic resonance imaging, RF = rheumatoid factor.

Keywords: allergic parotitis, Fibrinous sialodochitis, Kussmaul disease, sialodochitis fibrinosa

Medicine (Baltimore). 2016; 95 (42): e5132



Zoledronic Acid Treatment in Primary Bone Marrow Edema Syndrome

Bryan Josué Flores-Robles, Jesus Sanz-Sanz, Adel Abel Sanabria-Sanchinel, Dixie Huntley-Pascual, José Luis Andréu Sánchez, José Campos Esteban, Ricardo Blanco, Carolina Merino-Argumanez, Maria Espinosa-Malpartida, Maria Consuleo Ramos-Giráldez, Hildegard Godoy-Tundidor, Maria Mercedes Jiménez-Palop, Carmen Barbadillo Mateos, Luis Fernando Villa-Alcázar, Carlos Maria Isasi & Juan Bartolome Mulero

To cite this article: Bryan Josué Flores-Robles, Jesus Sanz-Sanz, Adel Abel Sanabria-Sanchinel, Dixie Huntley-Pascual, José Luis Andréu Sánchez, José Campos Esteban, Ricardo Blanco, Carolina Merino-Argumanez, Maria Espinosa-Malpartida, Maria Consuleo Ramos-Giráldez, Hildegard Godoy-Tundidor, Maria Mercedes Jiménez-Palop, Carmen Barbadillo Mateos, Luis Fernando Villa-Alcázar, Carlos Maria Isasi & Juan Bartolome Mulero (2017) Zoledronic Acid Treatment in Primary Bone Marrow Edema Syndrome, Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy, 31:1, 52-56, DOI: [10.1080/15360288.2016.1276993](https://doi.org/10.1080/15360288.2016.1276993)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15360288.2016.1276993>



Published online: 17 Feb 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 94



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

ORIGINAL ARTICLE

OPEN

Initial Treatment in Septic Arthritis: Medical Versus Surgical Approach

An 8-Year, Single Center in Spain Experience

Bryan Josué Flores-Robles, MD,* Mercedes Jiménez Palop, MD,* Abel Alejandro Sanabria Sanchinel, MD,† Robert Francis Andrus, MD,‡ Ana Royuela Vicente, MD,§ Marta Isabel Sanz Pérez, MD,|| María Espinosa Malpartida, MD,* Consuelo Ramos Giráldez, MD,* Carolina Merino Argumanez, MD,* Luis Fernando Villa Alcázar, MD,* José Luis Andréu Sánchez, MD, PhD,* Hildegarda Godoy Tundidor, MD,* José Campos Esteban, MD,* Jesús Sanz Sanz, MD,* Carmen Barbadillo Mateos, MD,* Carlos Isasi Zaragoza, MD,* and Juan Mulero Mendoza, MD, PhD*

Objective: The aim of this study was to compare the functional results of 2 different procedure types, medical or surgical, which are used in treating native joint septic arthritis.

Methods: In this retrospective cohort study, we reviewed clinical registries of patients admitted to a single third-level hospital with the diagnosis of septic arthritis during the period of January 1, 2008, to January 31, 2016.

Results: A total of 63 cases of septic arthritis were identified in which the initial approach for 49 patients was medical (arthrocentesis), whereas the initial approach for 14 patients was surgical (arthroscopy or arthrotomy). Of the 49 patients who received initial medical treatment (IMT), 15 patients (30%) later required surgical treatment because of poor progress. The median age of the patients was 60 (SD, 18) years. The group who received IMT had a greater median age than did those who received initial surgical treatment (median, 64 years [interquartile range (IQR), 54–76 years], vs. 48 years [IQR, 30–60 years]). There was a greater percentage of male patients in the surgical group (78% vs. 42% [$P = 0.018$]). Thirty percent of the medical group had been receiving corticosteroid treatment ($P = 0.018$). Results of complete recovery of joint functionality showed no significant differences after 1 year (68% with MT vs. 67% with ST, $P = 0.91$). Both groups had similar symptom duration until diagnosis, duration of antibiotic therapy (median, 30 days [IQR, 28–49 days], vs. 29.5 days [IQR, 27–49] days), and mortality rate (3 in the medical group).

Conclusions: The results of the study show that initial surgical treatment in patients with native joint septic arthritis is not superior to IMT. However, half of the patients with shoulder and hip infections treated with IMT eventually required surgical intervention, suggesting that perhaps this should be the preferred initial approach in these cases.

Key Words: arthritis, septic arthritis

(*J Clin Rheumatol* 2019;00: 00–00)

Septic arthritis is an arthropathy caused by the invasion of microorganisms, (commonly bacteria) of the synovial membranes, resulting in purulent effusion in the joint capsule, by direct inoculation or secondary hematogenous dissemination, with the consequent destruction of the synovial membranes.^{1,2} Clinical characteristics include pain, erythema, and swelling with reduced range of articular movement. The reported incidence is 7.8 cases per 100,000 persons per year, with a mortality rate of approximately 10%.³ Delayed diagnosis and treatment may result in irreversible joint damage and permanent disability and/or death.⁴ The standard therapeutic modality includes intravenous administration of broad-spectrum antibiotics and drainage of the affected joint by daily needle aspirations or by surgical procedures such as arthroscopy or arthrotomy. The selection of the type of drainage is generally based on the experience of the treating physician. Data that describe the effectivity of each type of intervention are based on small studies and systemic literature reviews, which show that an initial surgical approach is not superior to serial needle aspirations.^{5–8}

The objective of the present study was to compare the functional results of patients diagnosed as having septic arthritis and treated with initial medical treatment (IMT) with those treated with initial surgical treatment (IST). Both groups received antibiotic therapy according to hospital protocol.

J Clin Rheumatol. 2019; 25(1): 4-8.

Received:
6 February 2018

Revised:
28 June 2018

Accepted:
11 October 2018

Gene's hubs in retinal diseases: A retinal disease network

Cite as: J. M. Lázaro-Guevara,
B. J. Flores-Robles,
K. Garrido,
V. Pinillos-Aransay,
A. Elena-Ibáñez,
L. Merino-Meléndez,
J. A. López-Martínez,
R. Victoriano-Lacalle. Gene's
hubs in retinal diseases: A
retinal disease network.
Heliyon 4 (2018) e00867.
doi: 10.1016/j.heliyon.2018.
e00867



J. M. Lázaro-Guevara^{a,1}, B. J. Flores-Robles^{b,1,*}, K. Garrido^c, V. Pinillos-Aransay^b,
A. Elena-Ibáñez^b, L. Merino-Meléndez^b, J. A. López-Martínez^b,
R. Victoriano-Lacalle^d

^a Department of Human Genetics, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA

^b Rheumatology Department, San Pedro Hospital, Logroño, Spain

^c Paediatrics Department Guatemalan Social Secure Guatemala, Guatemala

^d Family Medicine, Nájera, Logroño, Spain

* Corresponding author.

E-mail address: aldolasa@hotmail.com (B.J. Flores-Robles).

¹ Both J. M. Lázaro-Guevara and B. J. Flores-Robles share the first authorship.

Heliyon. 2018; 4(10): e00867

Clinical and genetic characteristics of ankylosing spondylitis patients with peripheral arthritis at disease onset

J. Polo y La Borda¹, M. Szczypiorska², N. Bartolomé², J. Campos¹, B.J. Flores-Robles¹, J. Sanz¹, C. Fernández-Espartero³, T. Clavaguera⁴, R.F. Andrus⁵, M. Artieda², D. Tejedor², A. Martínez², J. Mulero¹, C.M. Isasi¹, J.L. Andréu¹, A. Sánchez¹

¹Department of Rheumatology, IDIPHIM University Hospital Puerta de Hierro Research Institute, Madrid, Spain; ²I+D Department, Progenika Biopharma SA, Bizkaia, Spain; ³Rheumatology Unit, Hospital Universitario de Móstoles, Madrid, Spain; ⁴Rheumatology Unit, Hospital de Palamós, Girona, Spain; ⁵Independence Polyclinic, Belize, Central America.

Abstract

Objective

The aim of this study was to assess the clinical and genetic characteristics associated with the presence of peripheral arthritis (PA) at disease onset in patients with ankylosing spondylitis (AS).

Methods

456 Spanish AS patients, diagnosed according to the modified New York Criteria, who had at least ten years of follow-up since initial disease onset were selected from the National Spondyloarthropathies Registry (REGISPONER). 18.9% of AS patients initially presented PA. Clinical variables and 384 single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed in 190 genes were analysed. SNP genotyping was performed using the Illumina GoldenGate genotyping platform. Association tests for allele frequencies and for categorical clinical variables were performed by the χ^2 test and with the unpaired *t*-test for continuous variables. *p*-values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

AS patients with PA showed an earlier age of disease onset ($p=0.021$), longer disease duration ($p=0.020$) and longer duration of AS symptoms from onset ($p=0.034$) than AS patients without PA. We found significant associations with the presence of PA at disease onset in 14 SNPs located in 10 genes: HLA-DQB2 (rs2857210 and rs9276615), HLA-DOB (rs2857151, rs2621332 and rs1383261), JAK2 (rs7857730), IL-23R (rs11209008 and rs10489630), CYP11B1 (rs1056836), NELL1 (rs8176786), KL (rs564481), and MEFV (rs224204), IL-2RB (rs743777) and IL-1A (rs1800587).

Conclusion

Both clinical and genetic factors are associated with the presence of PA at disease onset in Spanish AS patients. The results suggest that this subset of AS patients with PA at disease onset might have differentiation factors involved in disease pathogenesis.

Key words

ankylosing spondylitis, peripheral arthritis, single nucleotide polymorphism, JAK2, IL-23R, genetics



The Journal of Rheumatology

Volume 45, no. 10

High Reproducibility of an Automated Measurement of Mobility for Patients with Axial Spondyloarthritis

Juan L. Garrido-Castro, Rafael Curbelo, Ramón Mazzucchelli, María E. Domínguez-González, Cristina Gonzalez-Navas, Bryan J. Flores Robles, Pedro Zarco, Juan Mulero, Luis Cea-Calvo, María J. Arteaga, Pilar Font-Ugalde, Loreto Carmona and Eduardo Collantes-Estevez

J Rheumatol 2018;45:1383-1388
<http://www.jrheum.org/content/45/10/1383>

1. Sign up for TOCs and other alerts
<http://www.jrheum.org/alerts>
2. Information on Subscriptions
<http://jrheum.com/faq>
3. Information on permissions/orders of reprints
http://jrheum.com/reprints_permissions

The Journal of Rheumatology is a monthly international serial edited by Earl D. Silverman featuring research articles on clinical subjects from scientists working in rheumatology and related fields.

J Rheumatol. 2018 45(10): 1383-1388.